

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHEL SALAMANCA COELHO

OTIMIZAÇÃO DE MÚLTIPLAS RESPOSTAS NA EXTRAÇÃO DE
METABÓLITOS ESPECIAIS DE FOLHAS SECAS DE *Eucalyptus badjensis*
BEUZEV. & WELCH, MYRTACEAE, ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO DE
MISTURAS DO TIPO SIMPLEX-CENTROID E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE
RESPOSTA.

CURITIBA

2014

MICHEL SALAMANCA COELHO

OTIMIZAÇÃO DE MÚLTIPLAS RESPOSTAS NA EXTRAÇÃO DE
METABÓLITOS ESPECIAIS DE FOLHAS SECAS DE *Eucalyptus badjensis*
BEUZEV. & WELCH, MYRTACEAE, ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO DE
MISTURAS DO TIPO SIMPLEX-CENTROID E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE
RESPOSTA.

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas pelo Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor
de Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tomoe Nakashima

CURITIBA

2014

Coelho, Michel Salamanca

Otimização de múltiplas respostas na extração de metabólitos especiais de folhas secas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, Myrtaceae, através do planejamento de misturas do tipo Simplex-Centroid e análise de superfície de resposta / Michel Salamanca Coelho – Curitiba, 2014.
95 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Tomoe Nakashima
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná,

1. *Eucalyptus badjensis*. 2. Myrtaceae. 3. Simplex-Centroid. 4. Superfície resposta. I. Nakashima, Tomoe. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

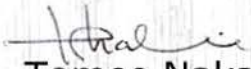
CDD 583.42


TERMO DE APROVAÇÃO

MICHEL SALAMANCA COELHO

Título: "OTIMIZAÇÃO DE MÚLTIPLAS RESPOSTAS NA EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FOLHAS SECAS DE *Eucalyptus badjensis* BEUZEVILLE & WELCH, MYRTACEAE, ATRAVÉS DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS DO TIPO SIMPLEX-CENTROID E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Profª. Drª. Tomoe Nakashima
Orientadora


Profª. Drª. Elisa Perez
UNICENTRO/Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI)


Profª. Drª. Jane Manfron Budel
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Curitiba, 05 de setembro de 2014.

**Dedico esse trabalho a minha esposa Cristiane Loiva Reichert, aos
meus pais Lúcio Menechine Coelho e Maria Lúcia Pacheco Salamanca Coelho,
e aos meus sogros Cladis Reichert e Eduino Reichert.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me manter no caminho.

A minha esposa, amiga e colega de profissão, Cristiane Loiva Reichert por estar ao meu lado para compartilhar cada sorriso e cada lágrima.

Aos meus pais e sogros, pelo amor, força, amizade, apoio psicológico e financeiro.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Apoio ao Plano de Restruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pela concessão do apoio financeiro.

À orientadora Prof^a Dr^a. Tomoe Nakashima pela oportunidade de participar no seu projeto e grupo de pesquisa que possibilitaram a realização e o desenvolvimento deste trabalho.

À Embrapa Florestas, pelo material vegetal disponibilizado para o trabalho.

Ao professor Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos e orientados, por me acolherem no laboratório de Farmacognosia.

Ao doutorando Cleverson A. Martins por me apresentar a técnica do simplex-centroid.

Aos meus amigos Allan Lourenço, Romulo Pereira e Julio Okada, pela amizade e companheirismo.

Aos técnicos da central analítica, Maurício Passos e Maria da Graça Teixeira pelo auxílio e simpatia.

A todos que ajudaram de alguma forma.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

O estudo de metabólitos especiais presentes em plantas medicinais apresenta relevada importância, principalmente quando associado a efeitos farmacológicos. Para isto, avaliar o processo de extração destes metabólitos torna-se essencial, uma vez que é necessário utilizar um solvente extrator adequado que permita a extração do maior número e concentração possível de substâncias químicas dos tecidos vegetais. Desta forma, o presente trabalho realizou uma análise comparativa de solventes na extração de metabólitos especiais e atividade antioxidante das folhas secas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch através de design de misturas e superfície de resposta. Foi utilizado o planejamento estatístico de mistura de quatro componentes (água, acetona, metanol e etanol) para investigar as respostas: resíduo seco, teor de flavonoides, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de fosfomolibdênio e radical DPPH•. Os extratos foram analisados por CLAE-DAD, obtendo-se perfis cromatográficos para comparação qualitativa dos mesmos. Os resultados demonstraram que a mistura ternária acetona:metanol:etanol foi a que apresentou maior valor de resíduo seco, porém, menor teor de fenólicos totais. O solvente puro acetona foi o que apresentou maior teor de flavonoides totais. O solvente puro água, apesar de ter apresentado o mais baixo teor de flavonoides totais, foi o que apresentou maior teor de fenólicos. Ao avaliar a atividade antioxidante pelo método de fosfomolibdênio, a mistura binária água:etanol e a mistura quaternária água:metanol:etanol:acetona foram os extratos que apresentaram maior resposta. A atividade antioxidante pelo radical DPPH• apontou que a mistura ternária acetona:água:metanol foi o que apresentou menor valor de IC₅₀, enquanto que o solvente puro acetona e a mistura quaternária apresentaram maiores valores de IC₅₀. Para otimização do processo de extração, foi utilizado a metodologia para otimização de resposta numérica, combinando as várias respostas em uma única resposta composta. Foram atribuídos diferentes scores (1 a 5) para cada componente ou resposta, indicando a sua relativa importância. Dentre as soluções de otimização sugeridas por esta metodologia, destacam-se as misturas binárias água:metanol e água:etanol. Pode-se concluir que o solvente utilizado para a extração de metabólitos especiais de tecidos vegetais interferiu nas diferentes respostas avaliadas e que o planejamento estatístico de mistura pode ser utilizado como uma ferramenta para auxiliar na pesquisa e direcionamento de trabalhos futuros.

Palavras-chaves: *Eucalyptus badjensis*, Myrtaceae, Simplex-Centroid, Superfície de Resposta.

ABSTRACT

The study of special metabolites in medicinal plants have increasing importance, especially when associated with pharmacological effects. For this, the extraction process to evaluate these metabolites is essential because it is necessary to choose the better solvent to extract of the greatest possible number and concentration of chemical substances of plant tissues. Thus, this study conducted a comparative analysis of solvents in the extraction of secondary metabolites and antioxidant activity of *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch leaves dry using mixture design and response surface. The statistical design of mixture of four components (water, acetone, methanol and ethanol) was used to investigate the responses: yield, contents of total flavonoids and total phenolic content and antioxidant capacity. The extracts were analyzed by HPLC-DAD and qualitative chromatographic profiles were compared. The ternary mixture acetone:methanol:ethanol showed the largest crude extract yield, however, smallest content of total phenolic. The pure solvent acetone showed the highest content of total flavonoids. Despite pure solvent water showed smallest content of total flavonoids, it showed the largest content of phenolics. Antioxidant capacity was determined using phosphomolybdenum reaction and DPPH•. The binary mixture water:ethanol and quaternary mixture water:methanol:ethanol:acetone showed the better response by phosphomolybdenum method. The ternary mixture acetone:water:methanol showed the smallest IC50 and the acetone and the quaternary mixture pure solvent showed largest IC50 by DPPH• method. The process extraction optimization was obtained using a numerical answer (different scores for each component or responses). Among optimization solutions suggested by this methodology, it highlight the binary mixtures of water: methanol and water: ethanol. In conclusion, the solvent used for the secondary metabolites extraction in plant tissues interfered the crude extract responses and chemical compounds content. The mixture statistical design is a tool that can help to choose the better solvent extract and suggest future work.

Key words: *Eucalyptus badjensis*, Myrtaceae, Simplex-Centroid, Response surface.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONOIDES ENCONTRADOS NA NATUREZA.	42
FIGURA 2 –	CLASSIFICAÇÃO DOS TANINOS COM BASE NAS SUAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS.	31
FIGURA 3 –	PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DE TRÊS E QUATRO COMPONENTES EM REDE <i>SIMPLEX</i> . ..	35
FIGURA 4 –	PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DE TRÊS COMPONENTES EM REDE <i>SIMPLEX LATTICE DESING (SLD)</i>	37
FIGURA 5 –	PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DE TRÊS COMPONENTES EM REDE <i>SIMPLEX CENTROID DESING (SCD)</i>	38
FIGURA 6 –	GRÁFICOS DE DIAGNÓSTICOS DO MODELO CÚBICO ESPECIAL REDUZIDO PARA RESPOSTA RESÍDUO SECO.	53
FIGURA 7 –	CURVAS DE NÍVEL PARA O MODELO CÚBICO ESPECIAL REDUZIDO PARA RESPOSTA RESÍDUO SECO.	54
FIGURA 8 –	CURVA ANALÍTICA DO PADRÃO RUTINA E EQUAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS.	55
FIGURA 9 –	GRÁFICOS DE DIAGNÓSTICO DO MODELO ESPECIAL CÚBICO REDUZIDO PARA RESPOSTA TEOR DE FLAVONOIDES	58
FIGURA 10 -	CURVA DE NÍVEL PARA O MODELO CÚBICO ESPECIAL REDUZIDO PARA RESPOSTA TEOR DE FLAVONOIDE.	59
FIGURA 11 –	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO ÁCIDO GÁLICO E EQUAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.	60
FIGURA 12 -	GRÁFICOS DE DIAGNÓSTICO DO MODELO LINEAR PARA RESPOSTA TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.	63

FIGURA 13 -	CURVA DE NÍVEL PARA O MODELO LINEAR PARA RESPOSTA TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	64
FIGURA 14 –	GRÁFICOS DE DIAGNÓSTICO DO MODELO QUADRÁTICO REDUZIDO PARA RESPOSTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	67
FIGURA 15 -	CURVA DE NÍVEL PARA O MODELO QUADRÁTICO REDUZIDO PARA RESPOSTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	68
FIGURA 16 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO POR MÉTODO ANALÍTICO (CLAE-DAD), EM 240 NM (CINZA) E 280 NM (PRETO) DE EXTRATOS OBTIDOS COM SOLVENTES PUROS.	76
FIGURA 17 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO POR MÉTODO ANALÍTICO (CLAE-DAD), EM 240 NM (CINZA) E 280 NM (PRETO) DE EXTRATOS OBTIDOS COM MISTURAS BINÁRIAS.....	77
FIGURA 18 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO POR MÉTODO ANALÍTICO (CLAE-DAD), EM 240 NM (CINZA) E 280 NM (PRETO) DE EXTRATOS OBTIDOS COM MISTURAS TERNÁRIAS E QUARTENÁRIA.	78
QUADRO 1 –	CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE ACORDO A SUA ESTRUTURA QUÍMICA	25
QUADRO 2 –	ESTRUTURAS DE ALGUNS ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS DE OCORRÊNCIA NATURAL.	26
QUADRO 3 –	ESTRUTURAS DE ALGUNS ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS DE OCORRÊNCIA NATURAL.	27
QUADRO 4 –	PROPORÇÕES DOS SOLVENTES (ML) NAS DIFERENTES MISTURAS (MATRIZ DE PLANEJAMENTO).....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DESIGN DE MISTURA COM QUATRO FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); RESÍDUO SECO (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 ML; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.....	49
TABELA 2 -	ANOVA PARA O MODELO DE MISTURA ESPECIAL CUBICO REDUZIDO	51
TABELA 3 –	DESIGN DE MISTURA COM 4 FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 ML; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.....	56
TABELA 4 -	ANOVA PARA O MODELO DE MISTURA ESPECIAL CUBICO REDUZIDO	57
TABELA 5 -	DESIGN DE MISTURA COM 4 FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 ML; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.....	61
TABELA 6 -	ANOVA PARA O MODELO DE MISTURA LINEAR.....	61
TABELA 7 –	DESIGN DE MISTURA COM 4 FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: FOSFOMOLIBDÊNIO (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 ML; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.....	65
TABELA 8 -	ANOVA PARA O MODELO DE MISTURA QUADRÁTICO REDUZIDO	66
TABELA 9 -	DESIGN DE MISTURA COM 4 FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: RADICAL DPPH• (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 ML; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.....	69
TABELA 10 –	VALORES DE IC ₅₀ OBTIDOS PARA OS PADRÕES E EQUAÇÃO DA RETA.....	69
TABELA 11 -	ANOVA PARA O MODELO MÉDIA.....	70

TABELA 12 –	RESTRIÇÕES DEFINIDAS PARA A OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA DE MÚLTIPLAS RESPOSTAS.....	72
TABELA 13 –	SOLUÇÕES ENCONTRADAS PARA A OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA DE MÚLTIPLAS RESPOSTAS.....	72
TABELA 14 –	COMPARAÇÃO ENTRE O VALOR PREVISTO E O OBSERVADO PARA A SOLUÇÃO SUGERIDA APÓS OTIMIZAÇÃO.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromol
A	Acetona
A:E	Mistura entre acetona e etanol
A:M	Mistura entre acetona e metanol
A:M:E	Mistura entre acetona, metanol e etanol
A:W	Mistura entre acetona e água
A:W:E	Mistura entre acetona, água e etanol
A:W:M	Mistura entre acetona, água e metanol
A:W:M:E	Mistura entre acetona, água, metanol e etanol
Abs	Absorvância
ANOVA	Análise de variância
BM	Banho-maria
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector por arranjo de diodos
DPPH•	Radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
E	Álcool etílico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ER	Equivalentes de Rutina
FM	Fase móvel
g	Grama
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Concentração necessária para reduzir em 50% o DPPH•
M	Álcool metílico
M:E	Mistura entre metanol e etanol
min	Minuto

mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mo	Molibdênio
MV	Material vegetal
nm	Nanômetro
r	Replicata
R ²	Coeficiente de Determinação/Varição/Correlação
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta
SLD	Simplex Lattice Design
SCD	Simplex Centroid Design
SM	Solução mãe
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UV	Ultravioleta
v	Volume
VIS	Visível
W	Água
W:E	Mistura entre água e etanol
W:M	Mistura entre água e metanol
W:M:E	Mistura entre água, metanol e etanol
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1	FAMÍLIA MYRTACEAE	20
3.2	GÊNERO <i>Eucalyptus</i>	20
3.2.1	Principais metabólitos no gênero <i>Eucalyptus</i>	22
3.2.1.1	Óleos voláteis	22
3.2.1.2	Compostos fenólicos	24
3.2.1.2.1	Ácidos fenólicos.....	25
3.2.1.2.2	Flavonoides	27
3.2.1.2.3	Taninos	30
3.3	<i>Eucalyptus badjensis</i> BEUZEV. & WELCH	32
3.4	ATIVIDADE BIOLÓGICA	33
3.4.1	Atividade antioxidante.....	33
3.5	PERFIL QUÍMICO	34
3.6	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	34
3.6.1	Experimentos com misturas.....	34
3.6.1.1	Simplex Lattice Design (SLD).....	36
3.6.1.2	Simplex Centroid Design (SCD)	38
3.6.2	Metodologia de Superfície de Resposta (RSM).....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	41
4.2	DESIGN DE MISTURAS	41
4.3	PREPARO DOS EXTRATOS	42
4.4	RESÍDUO SECO	43
4.5	FENÓLICOS TOTAIS	43
4.6	FLAVONOIDES TOTAIS	44
4.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DO DPPH•	45

4.8	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO	46
4.9	ANÁLISE DE PERFIL CROMATOGRÁFICO	47
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	ANÁLISE DE RESULTADOS	49
5.1	RESÍDUO SECO	49
5.2	TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	54
5.3	TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	59
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO ..	64
5.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DPPH•	68
5.6	OTIMIZAÇÃO	70
5.7	ANÁLISE DE PERFIL CROMATOGRÁFICO	73
6	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	81
	APÊNDICE.....	88

1 INTRODUÇÃO

A importância que o estudo dos metabólitos especiais das plantas tem para sociedade está bem difundida. E um dos passos mais importantes nesse estudo é avaliar o processo de extração, com a finalidade de obter o maior número e concentração possível de substâncias químicas dos tecidos das plantas. E com o grande número de características e polaridades diferentes, o sucesso da extração vai depender do solvente extrator (BRUNS; SCARMINIO, 2008; LI *et al.*, 2004).

Uma forma de escolher o melhor solvente é avaliar dentro do triângulo de seletividade, que estabelece a classificação da propriedade dos solventes em termos de polaridade e interação (acidicidade, basicidade e momento dipolar), descrito primeiramente por Snyder, assim, o solvente é selecionado de acordo com suas características (COENEGRACHT-LAMERS, 1989).

Embora se saiba que uma grande parcela de constituintes dos metabólitos tenha alguma solubilidade à mistura metanólicas ou etanolólicas a 80%, um grande número de alcaloides é extraído com hidrocarbonetos ou solventes apolares, enquanto flavonoides e terpenos podem ser seletivamente extraídos em pH neutro com acetato de etila ou cetonas alifáticas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Sendo assim, o uso de solventes puros como extratores pode não ser suficiente para extrair o máximo de substâncias químicas da planta. E a maneira mais eficiente para a escolha do líquido extrator é através de planejamentos estatísticos.

Poucos trabalhos empregam o planejamento estatístico de misturas no desenvolvimento de método capaz de selecionar o líquido extrator com maior eficiência em relação aos grupos diferentes de metabólitos.

Esse tipo de planejamento é utilizado para minimizar o número de experimentos e para identificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os solventes que podem ser de grande importância para o processo de extração. Esses efeitos não podem ser preditos por modelos aditivos obtidos de experimentos utilizando apenas solventes puros. Os experimentos são executados usando uma mistura de solventes previamente escolhidos através

de critérios estatísticos para minimizar os erros da modelagem, bem como determinar o número de experimentos que deverão ser executados (BRUNS; SCARMINIO, 2008; ONNI *et al.*, 2003).

E tão importante quanto o processo de extração é o processo de identificação e separação dos compostos químicos extraídos. Uma das técnicas mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pois pode ser facilmente adaptada à quantificação individual dos componentes com base em seus metabólitos especiais, além de gerar a perfil químico para definir a identidade ou a qualidade de uma dada espécie (FAN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007).

Dessa forma, as técnicas mencionadas foram aplicadas para a espécie *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch, pois a mesma tem conhecida importância econômica na exploração de sua madeira e óleo essencial, mas não dos seus constituintes não voláteis e suas possíveis atividades biológicas ou aplicações industriais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Análise comparativa de solventes na extração de metabólitos especiais e atividade antioxidante das folhas secas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch através de design de misturas e superfície de resposta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de diferentes solventes no meio extrator nas respostas resíduo seco, teor de flavonoides, teor de fenólicos, atividade antioxidante (DPPH• e Fosfomolibidênio) e perfil cromatográfico (CLAE).
- Encontrar a melhor proporção da mistura do solvente extrator através de otimização de múltiplas respostas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae é compreendida por mais de cem gêneros e quase quatro mil espécies. Os gêneros com maior número de espécies são os gêneros *Eucalyptus* e *Eugenia*, correspondendo a um terço do total de espécies da família. É encontrada principalmente nas regiões tropical e subtropical, com distribuição dominante nas Américas e na Austrália (CRONQUIST, 1981; DAHLGREN; THORNE, 1984; JOHSON; BRIGGS, 1984; JOLY, 1985).

Os membros dessa família são árvores ou arbustos com folhas simples, geralmente opostas, com margens inteiras, sempre verdes, e caracteristicamente providas de cavidades secretoras de óleos essenciais, as quais podem ser visualizadas como pontos translúcidos na lâmina foliar. Estão inseridos nessa família pequenos arbustos de não mais do que dois metros de altura até grandes árvores de mais de cem metros, como algumas espécies do gênero *Eucalyptus* (DAHLGREN; THORNE, 1984; JOLY, 1985).

3.2 GÊNERO *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* foi descrito pela primeira vez, em 1788, quando o botânico francês Charles Luis L'Héritier de Brutelle publicou uma única espécie de um gênero novo, que ele chamou de *Eucalyptus*, a partir do grego: *Eu* (bem) e *Kalypto* (cobrir). Esses termos se referem ao formato globular arredondado dos frutos dessas árvores, onde o opérculo cobre as sementes até que as mesmas estejam totalmente desenvolvidas. Atualmente, mais de 800 espécies de *Eucalyptus* são conhecidas (BROOKER, 2002).

Embora este gênero seja nativo da Austrália e ilhas próximas, ele também é encontrado em muitos países, sendo inserido com sucesso. Essa

ampla distribuição se deve a muitas características favoráveis, incluindo altas taxas de crescimento, adaptabilidade ampla aos solos e clima, facilidade de manejo através do corte, madeira com propriedades valorizadas e ausência de pragas. Essas características tornam o *Eucalyptus* o gênero mais plantado no mundo (BROOKER, 2002).

A distribuição de sementes de eucalipto pelo mundo começou no início do século XIX. Em 1823, o Chile foi o primeiro país da América do Sul a introduzir o gênero, seguido de Argentina e Uruguai. Por volta de 1850, o Eucalipto começou a ser testado em Portugal, Espanha e Índia. As primeiras mudas chegaram ao Brasil em 1868, no Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, sendo que a introdução do gênero se fortaleceu no início do século XX, após estudos realizados por Edmundo Navarro de Andrade (MORA; GARCIA, 2000).

No Brasil, onde os eucaliptos são plantados em larga escala para a produção de madeira, uma estimativa realizada pela Embrapa apontou que a área plantada era de 3,2 a 5 milhões de hectares em 1996, enquanto que a estimativa mundial era de 13,4 milhões de hectares (TURNBULL; BOOTH, 2002). Estes dados servem como um bom indicativo de quão extenso e popular é o cultivo do eucalipto.

As espécies de eucaliptos a serem plantadas em um determinado local são selecionadas de acordo com a região e a intenção desse plantio, pois são centenas de espécies com propriedades físicas e químicas diversas, sendo utilizados para as mais diversas finalidades (BROOKER, 2002; PEREIRA *et al.*, 2000). Os principais produtos obtidos através desses plantios são: madeira (construção e combustível), celulose (fabricação de papel), taninos (curtimento de couros), óleos essenciais (indústria farmacêutica) e mel (TURNBULL; BOOTH, 2002). Além disso, em alguns países como Japão, extratos de folhas de *Eucalyptus* (*E. globulus* Labill) foram incluídos como aditivos alimentares naturais, devido a suas propriedades antioxidantes. Segundo Amakura e colaboradores (2002 e 2009), foram identificados como compostos majoritários nesses extratos o ácido gálico e elágico, eucaliptone e macropais A-E.

A composição química do gênero *Eucalyptus* é muito variada e é composta de estruturas voláteis e não voláteis. As propriedades medicinais e aromáticas são frequentemente associadas aos componentes voláteis presentes no gênero. A facilidade com que os óleos voláteis podem ser

analisados através de técnicas de cromatografia em fase gasosa (GC) e GC acoplado a outros equipamentos favoreceu a elucidação de estruturas de uma infinidade de constituintes dos óleos essenciais. Dessa forma, o número de compostos voláteis associados ao *Eucalyptus* sp., excede em muito o número de não-voláteis (BROPHY; SOUTHWELL, 2002).

Dentre os compostos não voláteis, podemos citar os flavonoides, taninos, triterpenos, cetonas de cadeia longa, glicosídeos, derivados do acilfloroglucinol e composto com mais de uma dessas entidades químicas (BROPHY; SOUTHWELL, 2002).

3.2.1 Principais metabólitos no gênero *Eucalyptus*

3.2.1.1 Óleos voláteis

Óleos voláteis, também chamados de óleos essenciais, óleos etéreos ou essências, são definidos como substâncias obtidas de plantas ou parte delas, através de métodos físicos de extração, como arraste de vapor d'água, ou pela expressão dos polícarpos de frutos cítricos. Ocorrem em estruturas secretoras especializadas, como em células oleíferas, ductos, cavidades ou tricomas glandulares (BRUNETON, 1991; EVANS; TREASE; EVANS, 2002; SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos voláteis são compostos voláteis (conforme sugerido pelo seu nome), com odor geralmente agradável e característico, solúveis em compostos orgânicos apolares (ex. éter) e com limitada solubilidades em água. Seu sabor é geralmente acre e picante, quando recém extraídos são incolores ou amarelados (com raras exceções), tem pouca estabilidade (ar, luz, calor, umidade e metais) e são opticamente ativos (BRUNETON, 1991; EVANS; TREASE; EVANS, 2002; SIMÕES; SPITZER, 2007).

Eles são, em sua grande maioria, constituídos de fenilpropanoides ou por terpenoides. Os fenilpropanoides estão presentes em menor número e são formados a partir do ácido chiquímico; os terpenoides se sobrepõem em

quantidade e tem sua origem em compostos derivados de unidades de isopreno, esse por sua vez tem sua origem a partir do ácido mevalônico (BRUNETON, 1991; EVANS; TREASE; EVANS, 2002; SIMÕES; SPITZER, 2007).

A função biológica desses óleos na planta é variada, podendo servir para atrair polinizadores, proteger contra predadores, inibir a germinação de outras plantas vizinhas e evitar a perda excessiva de água com a elevação da temperatura (BRUNETON, 1991; SIMÕES; SPITZER, 2007).

Além de sua função para a planta, os óleos essenciais e suas propriedades químicas e físicas são utilizados em várias áreas e com grande importância econômica. Dentre elas podemos citar a indústria de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas), cosméticas (perfumes e produtos de higiene) e farmacêuticas (propriedades terapêuticas e como aromatizantes em formulações) (SIMÕES; SPITZER, 2007).

A determinação da atividade terapêutica de uma espécie ou gênero não é tão simples de ser determinada como a de uma substância isolada, porque além de se tratar de uma mistura complexa, sua composição química pode ser alterada por diversos fatores. A determinação dessa composição baseia-se na genética, sendo geralmente específica para um determinado órgão e estágio de desenvolvimento, além de ser possível a existência de quimiotipos (botanicamente idênticos, mas quimicamente distintos). Além disso, existem fatores atrelados à planta (intrínsecos), fatores extrínsecos (ciclo de chuvas, clima, irradiação solar, nutrientes do solo, entre outros) e também processos de obtenção do material vegetal (BRUNETON, 1991; SIMÕES; SPITZER, 2007).

Alguns efeitos terapêuticos de óleos essenciais e seus constituintes já são bem estabelecidos na literatura. Como exemplo, podemos citar o efeito carminativo do óleo do funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.), que age sobre a musculatura lisa liberando os gases do trato gastrointestinal; a ação antisséptica do óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), agindo sobre bactérias e fungos patógenos, e expectorante, devido ação irritante sobre a mucosa; a ação digestiva do óleo de gengibre (*Zinziber officinale* Roscoe), que estimula as secreções do trato digestório; a ação cardiovascular do óleo de sálvia (*Salvia miltiorrhiza* Bunge.), que aumenta o ritmo cardíaco e a pressão arterial; a ação estimulante do sistema nervoso central (SNC) dos óleos

canforados, depressora do SNC do óleo de *Cymbopogon citratus* DC. e a capacidade de provocar convulsões do óleo de *Salvia miltiorrhiza* (BRUNETON, 1991; SIMÕES; SPITZER, 2007).

Óleos de mais de quinhentas espécies de *Eucalyptus* já foram destilados e sua composição química estudada, sendo descrito que eles são ricos em compostos terpênicos, especialmente o eucaliptol (1,8-cineol). Esse composto é empregado tanto na indústria farmacêutica, como na cosmética. Quando o interesse é medicinal, são usadas espécies que apresentam teor de eucaliptol, no óleo, acima de setenta por cento, como é o caso dos óleos obtidos das espécies *Eucalyptus globulus* Labill., *E. polybractea* R.T. Baker e *E. smithii* R.T. Baker. Dentre as muitas atividades desses óleos, também são mencionadas as atividades expectorantes, mucolítica e estimulante do epitélio brônquico. Além disso, óleos essenciais de uma série de espécies de *Eucalyptus* são usados em técnicas de aromaterapia na Europa e Japão (KONOSHIMA; TAKASAKI, 2002).

3.2.1.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são moléculas formadas durante o desenvolvimento da planta e estão geralmente envolvidas com a proteção contra radiação ultravioleta ou agressão por patógenos. Sua estrutura básica consiste de uma ou várias hidroxilas ligadas a anéis aromáticos. Estes compostos podem ser classificados de acordo com o número de fenóis que eles contêm e pelos elementos que ligam estes anéis (QUADRO 1).

Quando o composto apresenta somente um grupo funcional fenol, estes são chamados de compostos fenólicos, e quando são encontrados mais que um, eles são chamados de polifenólicos. O grupo dos fenólicos é representado principalmente pelos ácidos fenólicos, enquanto que o grupo dos polifenólicos é representado principalmente por flavonoides e taninos. Além disso, os fenólicos e polifenóis podem estar ligados com carboidratos, ácidos orgânicos e outros compostos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007; MANACH *et al.*, 2004; MINUNNI; BILIA, 2008).

Estrutura	Classe
C6	Fenóis simples
C6- C1	Ácidos fenólicos e compostos relacionados
C6- C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6- C3	Ácidos cinâmicos, cinamil aldeídos, cinamil álcools
C6- C3	Cumarinas, isocumarinas e chalconas
C15	Chalconas, auronas, diidrochalconas
C15	Flavanas
C15	Flavonas
C15	Flavononas
C15	Flavanonols
C15	Antocianidinas
C15	Antocianinas
C30	Biflavonoides
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzofenonas, xantonas e stilbenos
C6, C10, C14	Quinonas
C18	Betacianinas
Lignanas, neolignanas	Dímeros e oligômeros
Ligninas	Polímeros
Taninos	Oligômeros e polímeros
Flobafenos	Polímeros

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DE ACORDO A SUA ESTRUTURA QUÍMICA

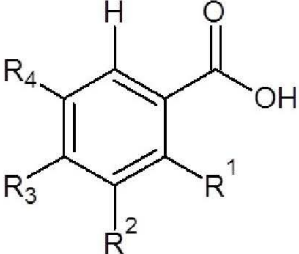
FONTE: VERMERRIS; NICHOLSON (2006)

Diversas atividades biológicas estudadas, como antioxidante, antimalárica, antibacteriana, antiviral, inibidora da HIV-RTase, inibidora da aldose redutase e atividades quimiopreventivas contra o câncer, estão relacionadas a compostos fenólicos e polifenólicos, isolados de espécies de *Eucalyptus* (KONOSHIMA; TAKASAKI, 2002).

3.2.1.2.1 Ácidos fenólicos

Ácidos fenólicos são grupos de metabólitos especiais amplamente distribuídos no reino vegetal. Naturalmente ocorrem de duas formas diferentes: hidroxibenzóico e hidroxicinâmico (QUADRO 2 e 3, respectivamente). A

variedade das estruturas está relacionada com o número e a posição da hidroxila no anel aromático, uma vez que o esqueleto básico permanece inalterado (STALIKAS, 2007).

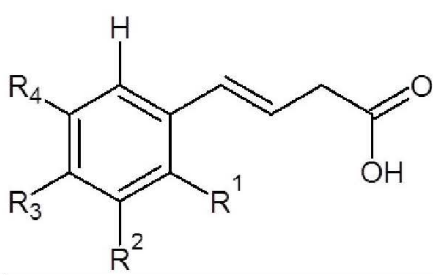
Ácidos Hidroxibenzóicos				
				
Name	R1	R2	R3	R4
Ácido Benzóico	H	H	H	H
Ácido p-Hidroxibenzóico	H	H	OH	H
Ácido Vanilínico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido Gálico	H	OH	OH	OH
Ácido Protocatecuico	H	OH	OH	H
Ácido Siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido Gentísico	OH	H	H	OH
Ácido Verátrico	H	OCH ₃	OCH ₃	H
Ácido Salicílico	OH	H	H	H

QUADRO 2 – ESTRUTURAS DE ALGUNS ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS DE OCORRÊNCIA NATURAL.

FONTE: STALIKAS (2007)

Alguns ácidos fenólicos estão presentes em quase todos os vegetais (cafêico, p-coumárico, vanílico, ferúlico e protocatequico) e outros têm ocorrência restrita a poucos indivíduos (gentísico e siríngico) (STALIKAS, 2007).

No gênero *Eucalyptus*, podemos encontramos uma variedade de ácidos fenólicos, exemplo disso é a presença do ácido gálico. O ácido gálico demonstra uma forte atividade antioxidante, sendo essa atividade maior que alguns antioxidantes conhecidos, como o α -tocoferol (KONOSHIMA; TAKASAKI, 2002).

Ácidos Hidroxicinâmicos				
				
Name	R1	R2	R3	R4
Ácido Cinâmico	H	H	H	H
Ácido o-Cumárico	OH	H	H	H
Ácido m-Cumárico	H	OH	H	H
Ácido p-Cumárico	H	H	OH	H
Ácido Ferúlico	H	OCH ₃	OH	H
Ácido Sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ácido Cafeico	H	OH	OH	H

QUADRO 3 – ESTRUTURAS DE ALGUNS ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS DE OCORRÊNCIA NATURAL.

FONTE: STALIKAS (2007)

3.2.1.2.2 Flavonoides

Dentre os produtos de origem vegetal, os flavonoides constituem o grupo mais importante e diversificado dos polifenóis. Tem grande distribuição no reino vegetal, principalmente na forma de heterosídeo solúvel em água. Pode ser encontrado em samambaias e em gimnospermas, porém com pequena diversidade, enquanto que em angiosperma estão representados em abundância, apresentando enorme diversidade estrutural. São conhecidos mais de quatro mil flavonoides diferentes e esse grande número de novas estruturas quase dobrou nas últimas duas décadas (BRUNETON, 1991; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Os flavonoides têm formas estruturais diversas. Porém, a grande maioria possui quinze átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por duas fenilas ligadas entre si por três carbonos (C₆-C₃-C₆). Nos compostos tricíclicos, as unidades básicas são chamadas de núcleos A, B e C

(FIGURA 1) (BRUNETON, 1991; DAI; MUMPER, 2010; EVANS; TREASE; EVANS, 2002; MANACH et al., 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

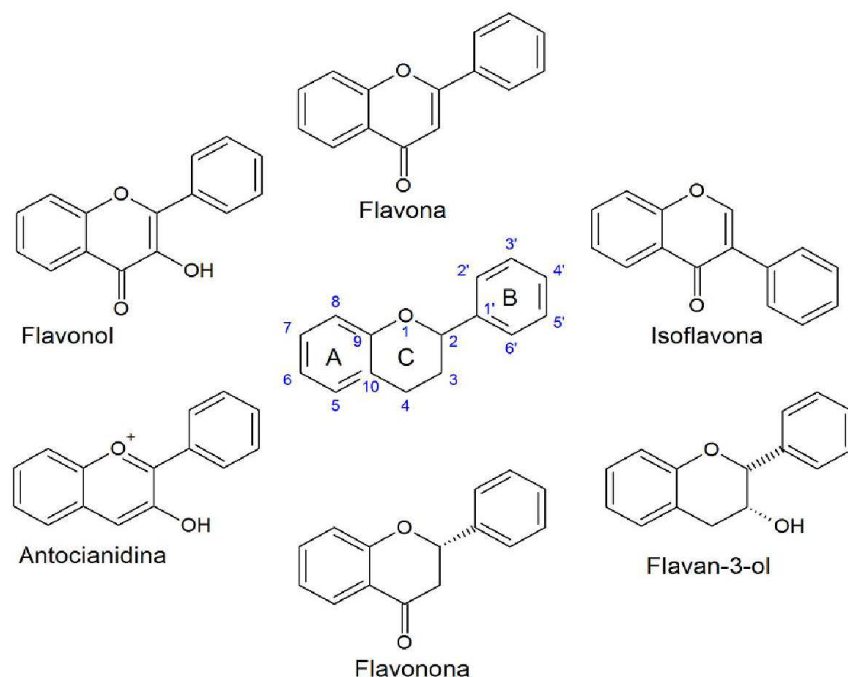


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONOIDES ENCONTRADOS NA NATUREZA.
FONTE: CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD (2006)

Os flavonoides podem ocorrer na forma livre (aglicona ou genina) ou na forma conjugada (heterosídeo). Os flavonoides de origem natural, geralmente são oxigenados e um grande número conjugado com açúcares, sendo chamados O-heterosídeos quando ligado por intermédio da hidroxila, e C-heterosídeos quando a ligação se dá entre átomos de carbonos (EVANS; TREASE; EVANS, 2002; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

As principais classes de compostos do grupo dos flavonoides são as flavonas, flavonóis (e seus O-heterosídeos), C-heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas, di-hidro-flavonóis, flavanonas, di-hidro-chalconas,

flavanas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonoides, neoflavonoides e biflavonoides (FIGURA 1) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Nas plantas, os flavonoides são responsáveis por inúmeras funções, dentre elas podemos citar a proteção da radiação ultravioleta, de insetos, fungos vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle de hormônios; agentes alelopáticos; e inibidores de enzimas (BRUNETON, 1991; EVANS; TREASE; EVANS, 2002; GOULD; LISTER, 2006).

Devido a sua grande variedade estrutural e química, existe uma grande diversidade de propriedades relacionadas aos flavonoides, tornando-os de interesse econômico. Os flavonoides são empregados na indústria alimentícia, na tanagem de couros, na indústria cosmética e farmacêutica (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Podemos citar como ação terapêutica dos flavonoides as ações anti-inflamatória, antialérgica, hepatoprotetora, antiespasmódica, tratamento de artereopatias, sedativa, ansiolítica e um pronunciado efeito antioxidante. Sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions bivalentes dá aos flavonoides a capacidade de ativar sistemas de enzimas, como as ciclooxigenases e lipoxigenases; e inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação plaquetária (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; SILVA *et al.*, 2002).

A atividade antioxidante é possível pela composição e estereoquímica dos flavonoides, pois apresentam uma estrutura de três anéis com radicais oxigenados ligados a ele. Além de que, no anel C, grupos hidroxil ligados na posição carbônica *trans* e as duplas ligações entre os carbonos dois e três, somados ao número de radicais hidroxil ligados aos anéis A e B, são estruturas que aumentam esta propriedade farmacológica (NIJVELDT *et al.*, 2001; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Assim como em outras espécies, flavonoides também foram identificados em espécies do gênero *Eucalyptus*, presentes principalmente nas folhas, cascas e na madeira. Podemos citar como exemplos o flavonoide eucaliptina (5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-6,8- dimetilflavona), isolado das folhas do *E. maculata* Hook., que em estudo realizado demonstrou atividade antimicrobiana frente a sete cepas (TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004); a quercetina,

isolado das folhas *E. camaldulensis* Dehnh., com pronunciado efeito anti-inflamatório (CONDE; CADAHÍA; GARCÍA-VALLEJO, 1997); e a rutina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavone-3-ramnoglicosídeo), um flavonol glicosídico, isolado de folhas de *E. youmanii* Blakely & McKie, cujo composto é presente em pouquíssimas espécies, sendo o seu efeito farmacológico, entre outros, o de aumentar a permeabilidade capilar (vasos sanguíneos) e a atividade antioxidante (BROPHY; SOUTHWELL, 2002).

3.2.1.2.3 Taninos

Os taninos são substâncias complexas e de difícil definição. Entretanto muitos autores os definem como substâncias fenólicas, solúveis em água, com massa molecular entre trezentos e três mil Daltons, reagem nos testes habituais dos fenóis e precipitam com alcaloides, gelatinas e outras proteínas. Porém, essa definição deixa de fora substâncias recentes, que apresentam estrutura molecular compatível com taninos e massa molecular de até dois mil Daltons (KHANBABAEE; VAN REE, 2001; SANTOS; MELLO, 2007).

Naturalmente, taninos têm uma ampla distribuição no reino vegetal, podendo ser encontrados em uma grande variedade de espécies de plantas superiores. Grandes concentrações de taninos são encontradas em todas as partes da planta, assim como na casca, madeira, folhas, frutos, raízes e sementes. Quando a planta sofre algum dano ou doença, frequentemente a concentração de taninos aumenta. Fato que podemos relacionar com sua possível função na planta, a de proteger contra infecções, insetos ou animais herbívoros (SANTOS; MELLO, 2007).

Com base nas características estruturais dos taninos, podemos subdividi-los em quatro grandes grupos (FIGURA 2): galotaninos (1), que são todos os taninos com unidades de galoil ou derivados, ligados com poliol, catequina ou triterpenoides; elagitaninos (2), que consistem em taninos onde pelo menos duas unidades de galoil, estão ligadas por ligações carbono-carbono entre si e não contém unidades catequinas ligadas glicosidicamente; taninos complexos (3), que são taninos em que uma unidade de catequina está

ligada em um galotanino ou em um elagitano; e taninos condensados (4), que são proantocianidinas oligoméricas ou poliméricas formadas pela ligação do carbono quatro de uma catequina com carbono oito ou seis da catequina monomérica próxima (KHANBABAEE; VAN REE, 2001).

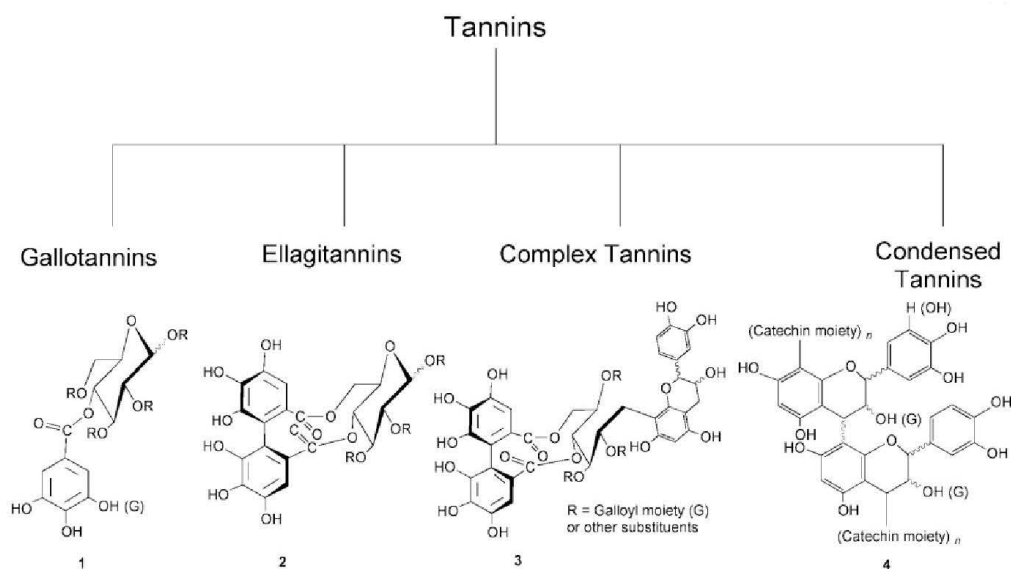


FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS TANINOS COM BASE NAS SUAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS.

FONTE: KHANBABAEE (2001).

As atividades biológicas dos taninos estão parcialmente ligadas a três características gerais comuns a todos os taninos em menor ou maior grau: a complexação com íons metálicos; atividade antioxidante sequestradora de radicais livres e habilidades de se complexar com outras macromoléculas, como proteínas e polissacarídeos. Algumas ações farmacológicas dos taninos já foram identificadas *in vitro*, como a ação bactericida e fungicida, antiviral, moluscicida, inibição da peroxidação de lipídeos e sequestrador de radicais livres, inibição enzimática e antitumoral (SANTOS; MELLO, 2007).

Além da indústria farmacêutica, os taninos são utilizados para diversas finalidades, desde a formação de polímeros com poder aglutinante, espumas de revestimento ou simplesmente para dar a sensação de adstringência em vinhos, sucos de frutas, chás e de outras bebidas (SANTOS; MELLO, 2007).

Conforme mencionado anteriormente, os taninos são amplamente distribuídos entre as plantas superiores, o que não seria diferente com o gênero *Eucalyptus*. Foram isolados dois taninos neste gênero, 1,2,6-tri-O-

galoil- β -d-glicose e tellimagrandine 1, sendo que o primeiro mostrou um pronunciado efeito antioxidante, acima dos antioxidantes sintéticos (OKAMURA *et al.*, 1993).

3.3 *Eucalyptus badjensis* BEUZEV. & WELCH

A primeira descrição da espécie *Eucalyptus badjensis* foi realizada em 1924, por Beuzev. & Welch, na montanha Big Badja, região sudeste da Austrália o qual serviu de inspiração para o seu nome popular (Big Badja Gum) e o nome científico desta espécie. Ela é caracterizada por ser uma árvore de tamanho médio alto, com imperfeições nas cascas do tronco, sendo estas mais suaves na parte superior do vegetal. Muito utilizada para sombra e abrigo, possui uma madeira de boa qualidade, de cor pálida e moderadamente durável, frutos e flores geralmente de pequeno tamanho com floração entre fevereiro e março (HIGA; HIGA; ALVES, 2002a).

Naturalmente ocorre principalmente na região sudoeste de Nova Gales do Sul (Austrália), entre 36° e 36°45' S, em altitudes que variam de 800 a 1200 metros. Este local é considerado uma região de clima temperado sub-úmido, com temperatura média máxima entre 22 a 25°C, e média mínima de -4 a 0°C. Nessa região são comuns geadas, ocorrendo mais de 100 por ano, não excluindo a possibilidade de neve durante o inverno (HIGA; HIGA; ALVES, 2002a).

Trabalhos realizados pela Embrapa no Sul do Brasil, mais precisamente em Santa Catarina e Paraná, têm mostrado que *E. badjensis* possui grande resistência a geadas, alta taxa de crescimento e grande potencial para produção de óleos essenciais (HIGA; HIGA; ALVES, 2002b).

O potencial para produção de óleos essenciais foi comprovado por estudos realizados na Austrália, no Uruguai e no Brasil, onde as espécies apresentaram rendimento de 2,8%, 1,25% e 4% do óleo essencial e concentração de 1,8 - cineol de 70%, 85,95% e 81,17% respectivamente (ANTÔNIO, 2007). Segundo a monografia de folhas e óleo do *E. globulus* Labill (WHO, 1999), para ser utilizado como medicinal o óleo essencial deve ter

rendimento superior a 2% e concentração do marcado 1,8 – cineol acima de 70%.

3.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.4.1 Atividade antioxidante

Compostos antioxidantes são definidos como agentes com o poder de retardar, inibir ou prevenir a oxidação de compostos oxidáveis, “eliminando” os radicais livres e diminuindo o estresse oxidativo. Estresse oxidativo ocorre quando radicais livres superam a capacidade antioxidante endógena, provocando a oxidação de uma variedade de biomacromoléculas, como enzimas, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Esse processo pode desencadear desde o envelhecimento precoce até o desenvolvimento e agravamento de doenças crônicas como o câncer (DAI; MUMPER, 2010; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

Dessa forma, a suplementação de agentes antioxidantes torna-se de suma importância, servindo como uma forma de prevenção que envolve uma relação inversa entre o consumo de alimentos ou suplementos ricos em agentes antioxidantes e o estresse oxidativo associado a doenças como o câncer, osteoporose e doenças cardiovasculares (DAI; MUMPER, 2010; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

Por isso, existe a necessidade da pesquisa de produtos e/ou compostos com atividade antioxidante potente e com facilidade de obtenção. As plantas e seu metabolismo secundário são importantes fontes desses compostos e sua atividade antioxidante é frequentemente associada aos compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, taninos e flavonoides. Compostos fenólicos tem sua atividade antioxidante associada aos seguintes mecanismos: remoção dos radicais livres, supressão da formação dos radicais livres e aumento ou proteção da defesa antioxidante endógena (DAI; MUMPER, 2010).

Existe um número grande de metodologias para determinação da atividade antioxidante, cada uma com suas vantagens e desvantagens. A escolha de uma metodologia depende das características necessárias a cada pesquisa. Quando trabalhos com múltiplas análises, devemos encontrar métodos eficazes, baratos e rápidos. Dentro dessas características, podemos citar como exemplo os métodos do DPPH• e Fosfomolibdênio. Esses métodos são confiáveis, amplamente utilizados e revisados (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

Dessa forma, ao avaliarmos a atividade antioxidante de uma planta, devemos relacionar a atividade à quantidade e/ou presença de grupos específicos de compostos, como os compostos fenólicos. A construção dessa relação, assim como a otimização dos processos de obtenção desses compostos, torna-se possível com mecanismos estatísticos e matemáticos de planejamento e análise de experimentos.

3.5 PERFIL QUÍMICO

O perfil químico é um tipo de método que mostra as informações químicas das plantas medicinais através de espectrogramas, cromatogramas e/ou outros gráficos obtidos por técnicas analíticas. A técnica ainda pode ser usada para investigar a diversidade dos componentes químicos entre plantas da mesma espécie, avaliar origem geográfica, estação da coleta, métodos ou processo de estocagem, avaliar extratos e misturas de plantas, entre outros (GARCIA, 2009).

3.6 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

3.6.1 Experimentos com misturas

As misturas são definidas como um conjunto de dois ou mais componentes, onde a função está relacionada à proporção de cada componente e não com o volume ou peso do conjunto. Um experimento com mistura utiliza misturas de proporções diferentes de cada componente, onde a somatória deles é sempre cem por cento, e obtêm respostas para cada conjunto.

Com a resposta de cada conjunto é possível, através de superfícies de resposta, a estimativa das propriedades de um sistema multicomponente, usando um número limitado de experimentos. Esses experimentos e as proporções de cada componente são pré-selecionados na tentativa de se determinar quais delas, de alguma forma, influenciam de alguma forma a resposta.

O experimento com misturas é diferente do usado em planejamento fatorial simples, pois no primeiro os componentes dependem da proporção dentro do conjunto, ou seja, são dependentes e no segundo são independentes. Dessa forma, a expressão espacial de misturas, denominada de *simplex* tem uma dimensão a menos do que o número de componentes ($q - 1$), assim um experimento com dois componentes ($q=2$) é expresso como uma reta, com três componentes ($q=3$), um triângulo e com quatro componentes ($q=4$), um tetraedro (FIGURA 3). No planejamento fatorial comum, cada componente representa uma dimensão, sendo chamado de q -cubóide (WANG; FANG, 2010).

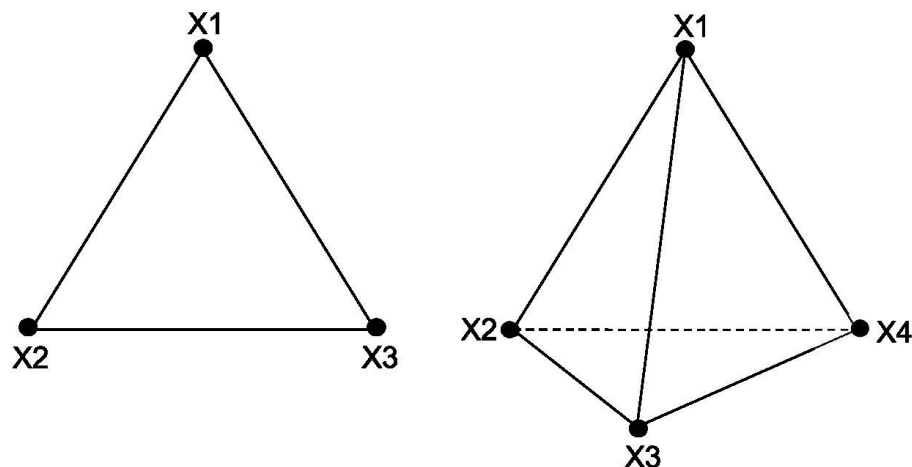


FIGURA 3 – PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DE TRÊS E QUATRO COMPONENTES EM REDE SIMPLEX.

De forma simplificada, *simplex* é o espaço experimental dimensional delimitado pelo número de componentes e sua proporção máxima e mínima pré-estabelecidas. O termo foi descrito pela primeira vez por Claringbold (1955), usando os conceitos descritos por Fisher (1954). São conhecidos vários modelos e os mais utilizados são o SLD e o SCD (SCHEFFE, 1958, 1963).

Dentro do espaço *simplex* são montados planejamentos de experimentos que permitem a estimativa de modelos matemáticos que irão representar o comportamento do sistema de misturas, percorrendo todo o espaço experimental, ou seja, os resultados obtidos no planejamento de mistura devem tornar possível, através dos resultados obtidos, o ajuste da equação de regressão para Superfície de Resposta (SR) (REIS; ANDRADE, 1996). São conhecidos vários modelos, os mais utilizados são o *simplex lattice design* (SLD) e o *simplex centroid design* (SCD) (SCHEFFE, 1958, 1963).

3.6.1.1 Simplex Lattice Design (SLD)

O modelo SLD, descrito por Scheffe (1958), consiste em delineamento onde os pontos são posicionados uniformemente sobre o espaço experimental e é descrito como {q,m}, onde o “q” representa o número de componentes e “m” é o grau do polinômio a ser ajustado. As proporções de cada componente assumem um número de pontos igual a “m” mais um (m+1), espaçados de zero até um (0–1). E o número de experimentos é dado pela equação 1.

$$C_{q+m+1}^m = \frac{(q + m - 1)!}{m! (q - 1)!} \quad (1)$$

Com base nas proporções estabelecidas na equação 2, todas as combinações possíveis dos constituintes da mistura podem ser consideradas. Isso quer dizer que em um sistema com três componentes (q=3), expresso

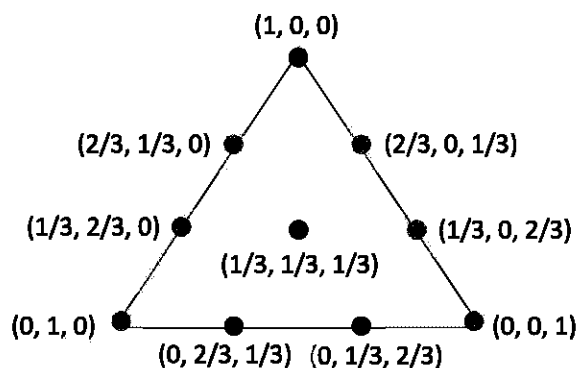
espacialmente como um triângulo equilátero, cada componente assumirá as proporções zero, um terço, dois terços e um (0, 1/3, 2/3 e 1) e o número de experimentos será igual a dez (10) (FIGURA 4).

(2)

$$xi = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m} \dots, 1 \quad \text{onde } i = 1, 2, 3 \dots, q$$

$$(x_1, x_2, x_3) = (1, 0, 0); (0, 1, 0); (0, 0, 1); \left(\frac{1}{3}, \frac{2}{3}, 0\right); \left(\frac{1}{3}, 0, \frac{2}{3}\right); \left(0, \frac{1}{3}, \frac{2}{3}\right);$$

$$\left(\frac{2}{3}, \frac{1}{3}, 0\right); \left(\frac{2}{3}, 0, \frac{1}{3}\right); \left(0, \frac{2}{3}, \frac{1}{3}\right); \left(\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3}\right)$$



Experimentos		Componente 1	Componente 2	Componente 3
1	Pura	1	0	0
2		0	1	0
3		0	0	1
4	Binária	2/3	1/3	0
5		2/3	0	1/3
6		1/3	2/3	0
7		1/3	0	2/3
8		0	2/3	1/3
9		0	1/3	2/3
10	Ternária	1/3	1/3	1/3

FIGURA 4 – PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DE TRÊS COMPONENTES EM REDE SIMPLEX LATTICE DESING (SLD).

3.6.1.2 Simplex Centroid Design (SCD)

O modelo SCD, descrito por Scheffe (1963), consiste de todos os subconjuntos, porém só nas concentrações onde os componentes aparecem em igual proporção (0, 1/2, 1/3, ..., 1/q). O número de experimentos é determinado pela equação 3, o que reduz o número de experimentos e ainda permite o ajuste de um modelo denominado cúbico especial.

(3)

$$(2^{q-1})$$

Assim, em um experimento com três componentes ($q=3$), teremos a mesma representação espacial *simplex*, um triângulo equilátero, com todos os conjuntos possíveis onde a proporção de cada componente é a mesma, ou seja, zero, um meio, um terço e um (0, 1/2, 1/3 e 1) e o número de experimentos será igual a sete (7) (FIGURA 5).

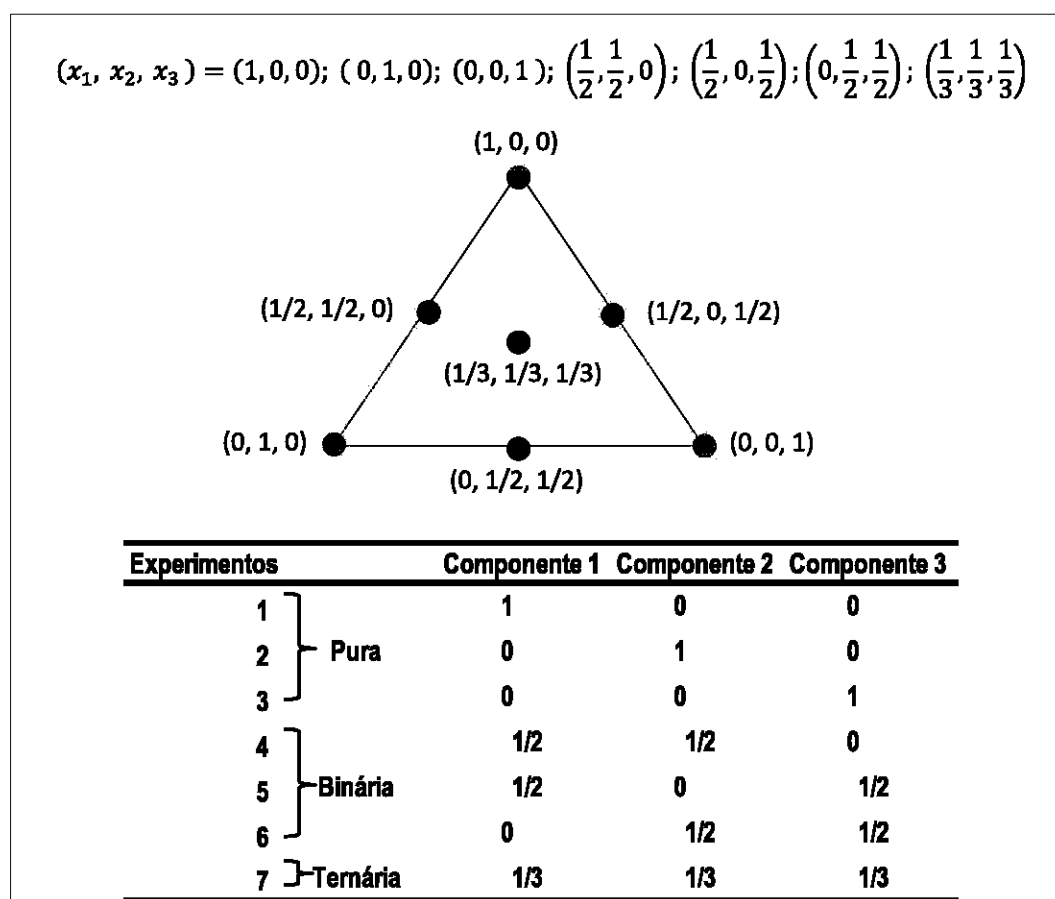


FIGURA 5 – PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DE TRÊS COMPONENTES EM REDE SIMPLEX CENTROID DESIGN (SCD).

3.6.2 Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

A RSM compreende um grupo de técnicas matemáticas e estatísticas usadas com a finalidade de construir um modelo funcional de relação entre a resposta de interesse e as variáveis independentes. Esse modelo torna possível a análise de como e quanto cada variável influencia cada resposta, sendo assim é possível maximizar ou minimizar cada resposta, de acordo com o interesse. Os modelos utilizados são os polinômios canônicos de Scheffé, usados especificamente para experimentos utilizando misturas. De forma geral as formas canônicas ou os modelos de regressão para misturas são: Linear, quadrático, cúbico completo e especial cúbico (BOX; DRAPER, 2007; KLEIJNEN, 2014; MYERS; ANDERSON-COOK, 2009; THOMPSON; MYERS, 1968).

Na escolha do modelo é necessário que os coeficientes destas equações sejam determinados por análise de regressão. A análise consiste em ajustar o modelo aos dados e assim verificar a adequação do modelo escolhido para representar a resposta.

Os parâmetros analisados por meio da aplicação do método dos mínimos quadrados. Existem inúmeras técnicas e estimativas utilizadas para testar a adequação do modelo, como: Teste de hipóteses para significância da regressão, teste da falta de ajuste, estimativas R^2 e R^2 ajustado; estimativas PRESS e R^2 previsto; e gráfico de resíduos (SMITH, 2005).

Teste de hipótese para significância da regressão é utilizado para determinar se há uma relação linear entre a resposta e qualquer das variáveis da regressão. Permitindo assim, determinar quais modelos se ajustam aos dados. O teste é geralmente resumido em uma tabela de análise de variância (ANOVA)(SMITH, 2005).

O teste de falta de ajuste é utilizado quando existem observações repetidas que permitem obter a estimativa de erro aleatório. Essa estimativa permite julgar se o modelo apresenta número de observações de modo satisfatório, ou a necessidade de acrescentar mais termos ao modelo (SMITH, 2005).

Estimativas R^2 e R^2 ajustado: O R^2 pode ser interpretado como uma medida da correlação da resposta com as variáveis. Entretanto, um grande valor de R^2 não implica necessariamente que o modelo é adequado, pois a adição de termos, mesmo que não significativos, aumenta o valor de R^2 mesmo que o termo não seja significativo. O que pode acarretar no risco de um superestimar o ajuste do modelo adicionando termos desnecessários. Com isso, é de grande utilidade o uso paralelo da estatística R^2 ajustado. Essa estatística pode diminuir ao se acrescentar termos não significativos ao modelo, reduzindo o risco de superestimar o ajuste. Um modelo com valor alto de R^2 ajustado é preferível (SMITH, 2005).

Estimativas PRESS e R^2 previsto: o PRESS é a medida de como o modelo ajusta cada ponto do projeto. Quando se compara dois ou mais modelos, o modelo com maior valor de PRESS geralmente é o escolhido. Já o modelo R^2 previsto é a medida da quantidade de variação em novos dados explicados pelo modelo. Alterações grandes entre o valor de R^2 ajustado e previsto indicam problemas com os dados ou com o modelo (SMITH, 2005).

O gráfico de resíduos: os resíduos do modelo representam o erro experimental do modelo ajustado. A representação dos resíduos padronizados em gráficos de probabilidade normal, versus o valor ajustado ou versus cada variável do modelo, desempenha um importante papel no julgamento da adequação do modelo. Esses gráficos são utilizados para detectar desvios de consideração de normalidade do erro experimental e pontos fora da tendência. Os resíduos bem maiores comparados com os demais são chamados pontos fora da tendência (outliers). A presença de um ou mais pontos fora da tendência pode distorcer a análise de variância (SMITH, 2005).

A maior aplicação para RSM é sem dúvida o meio corporativo industrial, principalmente em situações onde muitos componentes do produto ou etapas do processo podem influenciar de alguma forma, as medidas de qualidade do produto ou eficiência do processo (MYERS; ANDERSON-COOK, 2009). Entretanto a aplicação não é restrita ao mundo industrial, na pesquisa científica, por exemplo, podemos utilizá-la com a finalidade de desenvolver métodos mais eficientes de extração, desenvolver métodos analíticos e/ou otimizar formulações, guiados por respostas que podem ser características físicas, químicas ou até atividades biológicas do produto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Florestas) e foi coletado no campo experimental da empresa, situada no município de Colombo, região metropolitana de Curitiba, estado do Paraná, Brasil.

De acordo com dados obtidos pelo *Global Positioning System* (GPS), as coordenadas geográficas da Embrapa Florestas de Colombo são 25°32' S de latitude e 49°16' W de longitude. E a uma altitude de 920 metros acima do nível do mar.

Foram coletadas folhas adultas sadias e seus respectivos ramos no mês de março de 2013. O material foi mantido em local seco, protegido da luz e em temperatura ambiente por aproximadamente 15 dias, até que as folhas e ramos estivessem secos (BRASIL, 2010).

As folhas inteiras e sem contaminantes visíveis foram separadas dos ramos, trituradas e tamisadas, obtendo-se material vegetal com tamanho de partícula inferior a 250 μ m. As folhas trituradas foram pesadas e armazenadas em vidro hermeticamente fechado e protegidos da luz até a utilização.

4.2 DESIGN DE MISTURAS

O planejamento dos experimentos foi realizado através de dois programas, o Design-Expert® 7.0, da empresa Stat-Ease; e o Statistica® 8.0, da empresa StatSoft.

O design do experimento seguiu a metodologia de misturas do *Simplex* SCD, descrita por Scheffe (1963). Foram utilizados quatro solventes (água destilada, acetona – Biotec® 99.5%, metanol – Biotec® 99.8% e etanol – Biotec® 99.5%) como componentes da mistura e seis análises (resíduo seco,

teor de fenólicos totais, teor de flavonoides, atividade antioxidante e perfil cromatográfico) como repostas. Os solventes foram selecionados de acordo com a literatura, buscando solventes miscíveis entre si.

Dessa forma, o total de experimentos necessários para realização da análise foram quinze extrações. Entretanto, para o cálculo do erro experimental, três extrações foram repetidas, totalizando assim dezoito extrações (QUADRO 4).

	Acetona (A)	Água (W)	Metanol (M)	Etanol (E)
E	0,00	0,00	0,00	200,00
M	0,00	0,00	200,00	0,00
W	0,00	200,00	0,00	0,00
A	200,00	0,00	0,00	0,00
Mr	0,00	0,00	200,00	0,00
Wr	0,00	200,00	0,00	0,00
Ar	200,00	0,00	0,00	0,00
M:E	0,00	0,00	100,00	100,00
W:E	0,00	100,00	0,00	100,00
W:M	0,00	100,00	100,00	0,00
A:E	100,00	0,00	0,00	100,00
A:M	100,00	0,00	100,00	0,00
A:W	100,00	100,00	0,00	0,00
W:M:E	0,00	66,67	66,67	66,67
A:M:E	66,67	0,00	66,67	66,67
A:W:E	66,67	66,67	0,00	66,67
A:W:M	66,67	66,67	66,67	0,00
A:W:M:E	50,00	50,00	50,00	50,00

QUADRO 4 – PROPORÇÕES DE SOLVENTES (ML) NAS DIFERENTES MISTURAS (MATRIZ DE PLANEJAMENTO).

4.3 PREPARO DOS EXTRATOS

A extração dos metabólitos foi realizada por maceração a temperatura moderada e seguiu a metodologia proposta por (NAKASHIMA, 1993), com modificações realizadas pelo autor. As modificações consistem na alteração da proporção droga/líquido extrator e a composição do mesmo.

Para a extração, foram utilizados vidros de conserva com tampa, onde foram pesados aproximadamente vinte gramas (20 g) de folhas secas trituradas e adicionados duzentos mililitros (200 mL) de líquido extrator, de acordo com o proposto pelo *design* de experimento. Em ordem aleatória, cada vidro foi submetido à extração em banho-maria (BM) por duas horas, a uma temperatura de sessenta graus ($60 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Quando frios, os macerados foram filtrados à vácuo em funil de Büchner e papel de filtro. O volume dos extratos foi completado para duzentos mililitros, com os respectivos líquidos extratores e armazenados em vidros hermeticamente fechados, protegidos da luz e em refrigerador até o momento do uso.

4.4 RESÍDUO SECO

O método utilizado para o experimento foi baseado no método encontrado na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), com modificações realizadas pelo autor. Para cada extrato foram medidas alíquotas de 5 mL e adicionados em placa de Petri, previamente secas e pesadas. Essas foram submetidas a evaporação do solvente em BM e posteriormente secas em estufa à temperatura entre 100 e 105°C, por aproximadamente três horas. Quando secas, as placas foram colocadas em dessecador, até atingirem temperatura ambiente, sendo pesadas na sequência. As placas foram submetidas ao processo de secagem até atingirem peso constante (variação somente na última casa decimal). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em mg de resíduo seco por 5 mL.

4.5 FENÓLICOS TOTAIS

Para o doseamento de fenólicos totais, foi empregada a metodologia de Folin-Ciocalteu (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006), com adaptações descritas por Dudonné e colaboradores (2009) e Singleton e colaboradores (1999). O

método consiste na mensuração da intensidade da cor azul, formada pela redução dos constituintes do reagente de Folin-Ciocalteu, fosfotungstico (WO_4^{2-}) e fosfomolibdico (MoO_4^{2-}), na presença de hidroxilas fenólicas (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

A partir de cada extrato, foram preparadas soluções aquosas de concentração aproximada de 180 $\mu\text{g/mL}$ (± 2 $\mu\text{g/mL}$).

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio com tampa, onde foram adicionados 400 μL de extrato aquoso (amostras), água destilada (branco) ou solução padrão; 1600 μL de solução de carbonato de sódio (F. Maia[®]) a 7,5% em água destilada; e 2000 μL de reagente de Folin-Ciocalteu (Haloquímica) diluído uma parte para dez (1:10 v/v) de água destilada.

Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em espectrômetro UV-VIS (Shimadzu 1800), no comprimento de onda 765 nm em cubeta de quartzo com capacidade de 2, 5 mL e caminho óptico de 1 mm.

Como padrão, foram usadas diferentes concentrações de ácido gálico (Nuclear 98,0%) diluídas em água destilada, possibilitando a construção da curva analítica e obtenção da equação da reta. As concentrações utilizadas estão entre 92 e 185 $\mu\text{g/mL}$.

A ordem de análise de cada extrato foi aleatória, realizada em triplicata e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

4.6 FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de flavonoide foi obtido pela metodologia do cloreto de alumínio (AlCl_3), descrita por (LAMAISON; CARNAT, 1990), com adaptações realizadas pelo autor. É baseada na formação do complexo Flavonoide-Alumínio, deslocando o comprimento de onda de absorção máxima no ultravioleta para valores maiores, e dessa forma, diferenciando os flavonoides dos demais compostos fenólicos (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1995).

A partir de cada extrato, foram preparadas soluções metanólicas de concentração aproximada de 180 ± 2 $\mu\text{g/mL}$. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio com tampa, onde foram 1000 μL de extrato; 1000 μL de solução de Cloreto de Alumínio (AlCl_3) (Labsynth[®]) a 2%; e 2000 μL de água destilada.

Após quinze minutos de incubação à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em espectrômetro UV-VIS (Shimadzu 1800), no comprimento de 430 nm em cubeta de quartzo com capacidade de 2,5 mL e caminho óptico de 1 mm.

Como padrão, foram usadas diferentes concentrações de rutina (Merck[®]) diluídas em metanol, possibilitando a construção da curva analítica e obtenção da equação da reta. As concentrações utilizadas estão entre 8 e 97 $\mu\text{g/mL}$.

A ordem de análise de cada extrato foi aleatória, realizada em triplicata e os resultados foram expressos mg equivalentes de rutina por grama de extrato (mg ER/g).

4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DO DPPH•

A análise da atividade antioxidante pelo método do radical livre 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH•) é baseada na sua interação com compostos doadores de átomos de hidrogênio. Essa interação reduz o radical, alterando a cor da solução de violeta para amarelo e reduzindo a absorção em no comprimento de onda de 515 nm. Assim, a capacidade antioxidante da amostra é inversamente proporcional à concentração do radical na solução (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

Todas as análises foram realizadas em triplicata e com amostras em ordem aleatória. A reação foi feita em tubo de ensaio com tampa e lida em espectrômetro UV-VIS (Shimadzu 1800), no comprimento de onda de 515 nm.

Para construção da curva de analítica do radical DPPH•, foi preparada solução de DPPH• (Sigma - 90%) em metanol, na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. A partir dessa solução, foram preparadas diluições em concentração entre 4 e

40 µg/mL. Como “branco” foi utilizado o metanol (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Para as amostras, foram preparadas soluções em metanol com diferentes concentrações, de 5 a 250 µL/mL. E de cada diluição, foram pipetados 300 µL e adicionados a 2,7 mL de solução de DPPH• na concentração de 40 µg/mL. Após trinta minutos foram realizadas as leituras das absorvâncias. Como “branco” foi utilizado 300 µL de amostra e 2,7 mL de metanol (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Com os resultados da curva de calibração e dos valores de absorvância, foram determinados os percentuais de DPPH• remanescentes (% DPPH•_{REM}), segundo a equação abaixo:

$$\%DPPH\bullet_{REM} = [DPPH\bullet]_{T=t} / [DPPH\bullet]_{T=0} \times 100 \quad (4)$$

Onde $[DPPH\bullet]_{T=t}$ corresponde à concentração de DPPH• no meio após a reação com o extrato e $[DPPH\bullet]_{T=0}$ é a concentração inicial de DPPH•, ou seja, quarenta microgramas por mililitro (40 µg/mL) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Como controle positivo, foram usados os padrões de ácido ascórbico (Proquímios 99,7%; 3 – 15 µg/mL), ácido gálico (Nuclear 98,0%; 0,4 – 25 µg/mL) rutina (Merck, 0,43 – 27,75 µg/mL) e quercetina (Fluka Biochemika 98,0%; 0,15 – 19 µg/mL) em diferentes concentrações, diluídos em metanol.

Com base nos resultados, foi traçado uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra ou dos padrões e na ordenada a porcentagem de DPPH• remanescente (%DPPH•_{REM}). A partir da equação da reta, foi possível calcular a concentração necessária para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH• (IC₅₀) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; SOUSA *et al.*, 2007).

4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

O método espectrométrico para determinação da total capacidade antioxidante é baseado na redução íon molibdênio (Mo^{6+}), presente no reagente fosfomolibdênio (molibdato de amônio, 4 mM; fosfato de sódio, 28mM; e ácido sulfúrico, 0,6 M). A redução do íon Mo^{6+} para Mo^{5+} ocorre na presença de agente redutor/oxidante e promove a formação do complexo Fosfato/ Mo^{5+} , de coloração verde. Quanto maior a concentração do complexo e a atividade antioxidante, maior será absorvância da amostra no comprimento de onda de 695 nm (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Amostras e padrões foram diluídos em metanol na concentração aproximada de $180 \pm 2 \mu\text{g/mL}$. Após, 300 μL de amostra/padrão e 3000 μL do reagente foram adicionados em tubo de ensaio com tampa. Cada tubo foi hermeticamente fechado e levado a banho-maria (BM) por noventa minutos na temperatura de 95 °C. Quando frios, foi realizada a leitura em espectrofotômetro de Ultravioleta, UV-VIS, no comprimento de onda de 695nm, usando como “branco” metanol e o reagente (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Cada amostra foi analisada em triplicata e de forma aleatória. Como controle positivo, foram usados os padrões ácido ascórbico, ácido gálico e quercetina, diluídos em metanol.

Para o cálculo de atividade antioxidante, o padrão com maior absorvância foi considerado cem por cento (100%) e os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante. A equação para cálculo da atividade foi: (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999):

(5)

$$\% \text{ Ativ. antioxidante} = \frac{\text{Absorvância amostra} - \text{absorvância branco} \times 100}{\text{absorvância padrão} - \text{absorvância branco}}$$

4.9 ANÁLISE DE PERFIL CROMATOGRÁFICO

A análise de perfil cromatográfico dos diferentes extratos foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC ProStar Gradiente VARIAN - CLAE), equipado com bomba ternária (Solvent Delivery Module, modelo 230), detector de arranjo de fotodiodos (Photodiode Array Detector, modelo 335) e injetor automático (Auto Sampler, modelo 410).

Os extratos foram diluídos a $1,8 \pm 0,2$ mg/mL de resíduo seco em metanol, injetados no CLAE (15 μ L), separados utilizando coluna de fase reversa Kromasil® 100-5C18 (AkzoNobel, tamanho da coluna 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 μ m, poro de 100 Å, com Endcapped, Carbon load de 19%) acoplada a coluna guarda de mesmo empacotamento (Varian Meta Guard 4,6 mm Pursuit 5 μ C18), a temperatura ambiente (20°C), e em seguida, realizada a leitura em 240 nm e 280 nm. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de (A) água Milli Q e (B) metanol (J. T. Backer – grau HPLC), ambos acidificados com ácido orto-fosfórico a 0,1%. A eluição dos compostos presentes na amostra ocorreu com o fluxo de 1 mL/min, no modo gradiente, sendo: 0 a 60 min – 95% a 5% de A; 60 a 80 min – 5% de A.

Este método foi desenvolvido com o objetivo de se ter um perfil cromatográfico, com uma boa separação entre os diferentes picos, permitindo o acompanhamento do processo de extração, utilizando diferentes líquidos extratores.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando os softwares Statistica® 8.0 e Excel® 2010. Valores de α , limites e tipo de análise estatística realizado foram descritos em cada um dos ensaios.

5 ANÁLISE DE RESULTADOS

5.1 RESÍDUO SECO

A partir dos resultados das pesagens em triplicata, com auxílio do programa Statistica® 8.0, foi calculado a média e desvio padrão de cada uma das extrações (TABELA 1). As médias calculadas foram usadas para aplicar a metodologia de superfície de resposta, no programa Design Expert® 7.0. Os erros padrão do modelo foram estimados pelo erro experimental determinado pela replicata de três extrações.

TABELA 1 - DESIGN DE MISTURA COM QUATRO FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); RESÍDUO SECO (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 ML; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.

	Média mg/5 mL	Desvio Padrão	N	-95, % Cnf.Limt	+95, % Cnf.Limt
E	130,93	2,52	3	124,66	137,19
M:E	98,55	0,58	3	97,10	99,99
M	109,49	1,00	3	107,00	111,99
W:M:E	163,48	0,59	3	162,00	164,95
W:E	145,72	1,18	3	142,79	148,64
W:M	143,36	0,00	3		
W	89,32	0,59	3	87,85	90,79
A:W:M:E	115,97	2,09	3	110,77	121,17
A:M:E	175,63	2,09	3	170,43	180,83
A:W:E	171,43	1,16	3	168,55	174,32
A:W:M	122,58	0,58	3	121,14	124,02
A:E	148,37	2,65	3	141,78	154,96
A:M	164,31	1,54	3	160,50	168,13
A:W	147,48	1,53	3	143,68	151,28
A	98,13	0,11	3	97,85	98,41
M r	127,55	0,58	3	126,11	129,00
W r	92,46	0,64	3	90,87	94,04
A r	105,37	1,00	3	102,87	107,86
Total	128,07	27,68	54		

E – etanol; M – metanol; W – água; A – acetona; r – replicata. Cnf.Limt - 95% e 95% - Limite de confiança inferior e superior de 95%.

Os resultados variaram desde o maior valor, encontrado na mistura ternária acetona:metanol:etanol de $175,63 \pm 2,09$ mg/5 mL, até o menor valor, obtido na extração com o solvente puro água de $89,32 \pm 0,59$ mg/5 mL. A média de todas as dezoito extrações foi de $128,07 \pm 27,68$ mg/5 mL.

Os resultados encontrados foram adicionados aos programas já mencionados para análise pela metodologia de superfície de reposta. Posteriormente, foram aplicados modelos matemáticos (Scheffe), capazes de descrever o comportamento da amostra nas diferentes proporções da mistura. Assim como tornar possível a obtenção da proporção otimizada da mistura.

Na primeira parte da análise o programa Design Expert® 7.0, o programa faz a sugestão do modelo a ser testado. Essa sugestão é baseada principalmente em dois testes do ANOVA, o *Sequential Model Sum of Squares* (Soma dos quadrados sequencial dos modelos) e *Lack of Fit* (teste de falta de ajuste). O primeiro teste indica o modelo de ordem mais alta, ou seja, com maior número de termos significantes. E o segundo teste indica em qual modelo existe insignificância no teste falta de ajuste.

O modelo sugerido pelo programa foi o quadrático. Mas, nenhum dos modelos apresentou real significância a 95% de confiança e todos eles foram insignificantes ao teste de falta de ajuste. Uma probabilidade para esse fato é a presença de muitos termos fora da significância selecionada. Dessa forma, foi usado o mecanismo de seleção de termos denominado **backward elimination**, o mecanismo elimina os termos com valor de p ($\text{Prob}>F$) maior que o valor de significância selecionado.

Após a exclusão dos termos AWM, WME, AME e ME, o modelo selecionado foi o especial cubico reduzido. O valor de $F=4,72$ para o modelo implica que o modelo é significativo e existem somente 1,98% de chance desse valor ser atribuído ao ruído. E com relação ao teste de falta de ajuste, o modelo se mostrou ajustado com $F= 6,02$, ou seja, com 8,52% de chance desse valor ser relacionado ao ruído (TABELA 2).

O coeficiente ajustado de R^2 para o modelo é igual a 0,6630 e o valor máximo que R^2 poderia explicar é 0,8414. Além disso, o modelo mostrou valor de Precisão adequada = 6,522, relação sinal ruído maior do que o mínimo necessário que é 4, indicando que o modelo pode ser usado para percorrer a superfície de resposta. O experimento apresenta valor de R^2 previsto negativo,

igual a -0,083, o que significa segundo o programa que a média global seria um melhor modelo que o atual.

TABELA 2 - ANOVA PARA O MODELO DE MISTURA ESPECIAL CUBICO REDUZIDO

Fonte de variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p Prob>F	
Modelo	11372,1	9	1263,6	4,717	0,0198	Signif.
Linear	1394,9	3	465,0	1,736	0,2368	
AW	2539,3	1	2539,3	9,479	0,0151	
AM	3549,1	1	3549,1	13,249	0,0066	
AE	1534,5	1	1534,5	5,728	0,0436	
WM	1918,0	1	1918,0	7,160	0,0281	
WE	1677,0	1	1677,0	6,260	0,0368	
AWM	2718,6	1	2718,6	10,148	0,0129	
Residual	2143,1	8	267,9			
Lack of Fit	1948,9	5	389,8	6,0199	0,0852	Não signif.
Erro Puro	194,2	3	64,75			
Cor Total	13515,2	17				

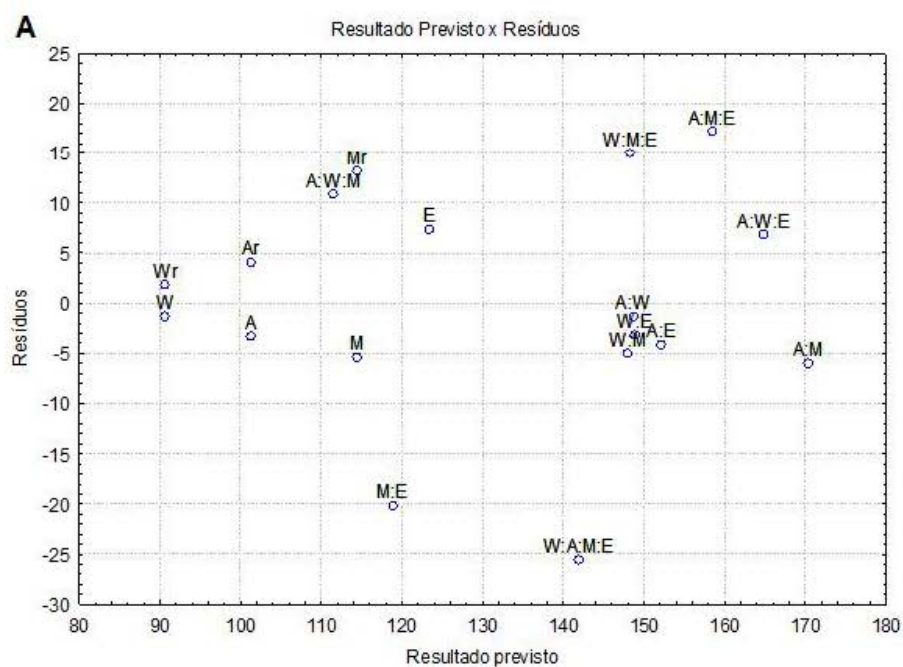
Desv. Padrão	16,37	R ²	0,841
Média	130,56	R ² Ajust	0,663
C.V. %	12,54	R ² Pred	-0,083
PRESS	14633,22	Precisão adequada	6,522

A equação abaixo (6) mostra a existência de seis termos significativos, onde o valor de p (Prob>F) está dentro do limite de significância. Analisando os coeficientes da equação verifica-se que nos termos binário há uma interação sinérgica em todas as misturas, principalmente entre os solventes acetona:água e acetona:metanol (1/2:1/2 v/v). A equação mostra também uma interação ternária antagônica na mistura acetona:água:metanol.

(6)

$$\begin{aligned} \text{RESÍDUO SECO} = & 101,45(\pm 11,52)A + 90,71(\pm 11,52)W + 114,57(\pm 11,01)M \\ & + 123,52(\pm 14,65)E + 210,74(\pm 68,45)AW + 249,03(\pm 68,42)AM + 159,51(\pm 66,65)AE \\ & + 183,07(\pm 68,42)WM + 166,75(\pm 66,65)WE - 1675,44(\pm 595,93)AWM \end{aligned}$$

A FIGURA 6A mostra que os resíduos deixados pelo ajuste estão distribuídos de forma aleatória, ou seja, graficamente não é possível visualizar nenhuma tendência de resultados. Na FIGURA 6B, observa-se que os extratos AM, AWE e AME estão entre as maiores respostas previstas.



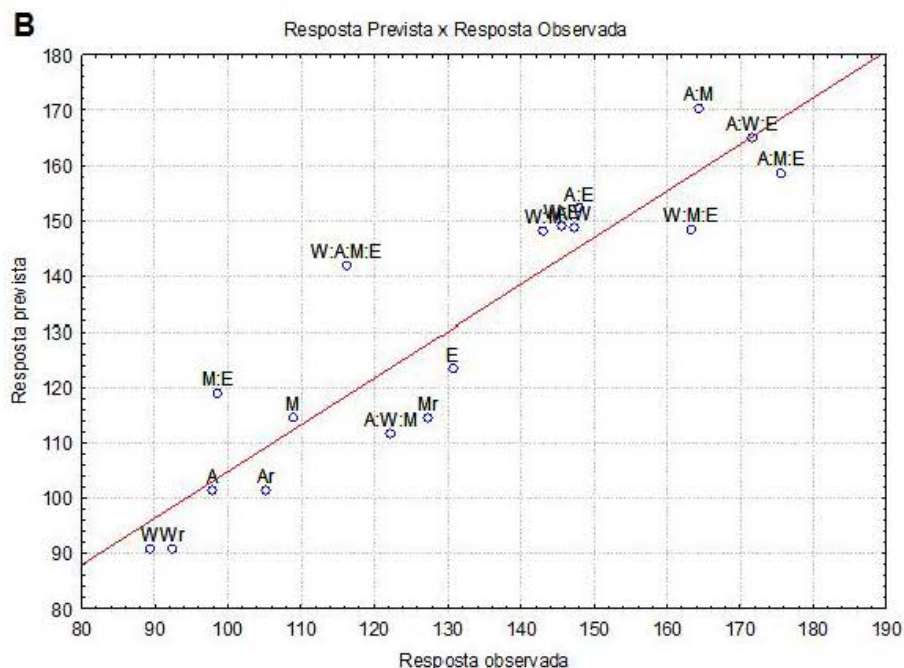


FIGURA 8 A, B – GRÁFICOS DE DIAGNÓSTICOS DO MODELO CÚBICO ESPECIAL REDUZIDO PARA RESPOSTA RESÍDUO SECO.

As curvas de nível para o modelo cúbico especial reduzido aplicado ao resultado Resíduo Seco podem ser visualizadas na FIGURA 7, onde o solvente etanol foi igualado a 25 para simplificar e representar em apenas duas dimensões a superfície de resposta. Os melhores resultados foram encontrados entre as misturas binárias de acetona:metanol e acetona:água.

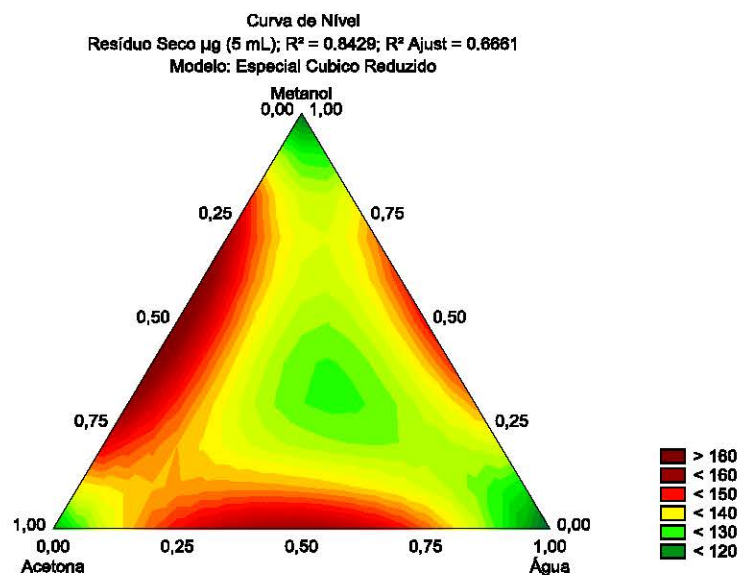


FIGURA 7 – CURVAS DE NÍVEL PARA O MODELO CÚBICO ESPECIAL REDUZIDO PARA RESPOSTA RESÍDUO SECO.

5.2 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

De acordo com a metodologia descrita, a partir da leitura da absorvância de soluções com várias concentrações diferentes do padrão rotina, foi construída uma curva de analítica e a partir dela foi obtida a equação da reta para o padrão (FIGURA 8). Com essa equação, as absorvâncias de cada amostra foram traduzidas para mg equivalentes de rutina em um grama de extrato (mg ER/g).

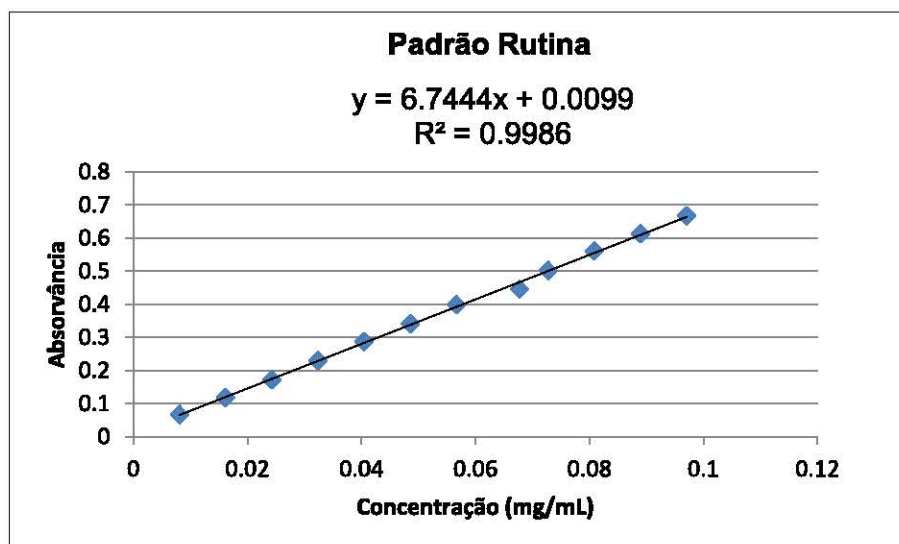


FIGURA 8 – CURVA ANALÍTICA DO PADRÃO RUTINA E EQUAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS.

Da mesma forma como foi feito na resposta anterior, a partir dos resultados encontrados em cada amostra e replicatas, foram calculadas as médias e desvio padrão (TABELA 3).

Os teores variaram desde o maior valor, encontrado no solvente puro Acetona de $468,22 \pm 10,04$ mg ER/g, até o menor valor, encontrado para na mistura ternária de água:metanol:etanol de $145,75 \pm 2,97$ mg ER/g. A média de todas as corridas foi de $265,67 \pm 95,90$ mg ER/g.

Para a metodologia de superfície de resposta, apenas o modelo linear não foi significativo com $\alpha = 0,05$ (nível de significância). E todos os modelos apresentaram falta de ajuste, mesmo com a retirada dos termos não significativos. Apenas com $\alpha = 0,03$, foi possível a escolha de um modelo que fosse insignificante ao teste de falta de ajuste.

O modelo escolhido foi o especial cúbico reduzido, com a retirada de termos insignificantes ao modelo. Os termos retirados do modelo são as misturas ternárias AME e AWM, deixando os termos binários ME, WM e AM por serem necessários à hierarquia dos termos.

De acordo com a TABELA 4, o modelo é significativo com o valor de F igual a 23,89, restando apenas à chance de 0,05% desse valor ser devido ao ruído. Com relação ao teste de falta de ajuste, o valor encontrado de F é 13,04, com apenas 3,16% de chance desse valor ser em decorrência do ruído.

TABELA 3 – DESIGN DE MISTURA COM 4 FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 ML; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.

	Média mg ER/g	Desvio Padrão	N	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
E	296,65	18,26	3	251,28	342,02
M:E	303,88	11,24	3	275,95	331,81
M	303,64	2,00	3	298,68	308,60
W:M:E	145,75	2,97	3	138,37	153,12
W:E	246,28	17,79	3	202,08	290,48
W:M	374,10	9,98	3	349,31	398,89
W	209,94	0,95	3	207,58	212,30
A:W:M:E	201,73	4,51	3	190,53	212,92
A:M:E	273,04	8,86	3	251,01	295,06
A:W:E	174,59	1,81	3	170,09	179,09
A:W:M	163,35	3,30	3	155,16	171,54
A:E	269,06	18,72	3	222,57	315,55
A:M	366,82	4,89	3	354,68	378,97
A:W	153,90	2,98	3	146,49	161,30
A	454,09	12,88	3	422,09	486,09
M r	299,22	4,95	3	286,92	311,51
W r	192,80	2,31	3	187,07	198,53
A r	468,22	10,04	3	443,28	493,16
Total	265,67	95,90	54		

E – etanol; M – metanol; W – água; A – acetona; r – replicata. Cnf.Limt - 95% e 95% - Limite de confiança inferior e superior de 95%.

Com relação ao coeficiente ajustado de R^2 para o modelo foi de 0,9368 e o máximo que o R^2 poderia explicar é 0,9777. Com valor de precisão adequada de 15,499 o modelo se mostra suficiente para que o modelo percorra a superfície de resposta. O R^2 previsto é igual a -0,9327 e assim como o modelo anterior, o programa sugere que a média global é melhor do que o modelo atual.

A equação 7, correspondente a esse modelo, mostra doze termos, sendo nove deles são significativos, onde o valor de p (Prob>F) está dentro do limite de 0,03 de significância. Os coeficientes da equação demonstram que a mistura binária de água:metanol (1/2:1/2 v/v) tem uma importante interação sinérgica. Além disso, temos uma interação antagônica nas demais misturas binárias e ternárias, principalmente com a presença de acetona ou etanol nas misturas ternárias.

TABELA 4 - ANOVA PARA O MODELO DE MISTURA ESPECIAL CUBICO REDUZIDO

Fonte de variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	P Prob > F	
Model	157753,9	11	14341,3	23,9	0,0005	Signif.
Linear	67098,9	3	22366,3	37,3	0,0003	
AW	29670,7	1	29670,7	49,4	0,0004	
AM	396,4	1	396,4	0,7	0,4475	
AE	12308,3	1	12308,3	20,5	0,0040	
WM	11031,5	1	11031,5	18,4	0,0052	
WE	25,4	1	25,4	0,0	0,8439	
ME	2,0	1	2,0	0,0	0,9561	
AWM	7356,7	1	7356,7	12,3	0,0128	
WME	16042,5	1	16042,5	26,7	0,0021	
Residual	3601,6	6	600,3			
Lack of Fit	3345,1	3	1115,0	13,0	0,0316	Não Signif.
Erro Puro	256,5	3	85,5			
Cor Total	161355,5	17				

Desv. Padrão	24,50	R²	0,978
Média	272,06	R² Ajust	0,937
C.V. %	9,01	R² Pred	-0,933
PRESS	311846,71	Precisão adequada	15,499

(7)

**Teor de Flavonoides = 461,22(±17,26)A +201,37(±17,29)W +301,85(±17,29)M
+296,78(±24,31)E -720,49(±102,48)AW
-83,28(±102,48)AM -452,96(±100,03)AE +467,81(±109,12)WM
-22,08(±107,39)WE -6,16(±107,39)ME -2756,98(±787,52)AWM
-4078,85(±788,99)WME**

A FIGURA 9A mostra os resíduos distribuídos de forma aleatória, ou seja, na observação de sua distribuição não é possível identificar uma tendência. Na FIGURA 9B, os resultados observados com os previstos estão alinhados a linha central, o que demonstra que o modelo está ajustado e consegue prever bem a resposta. Além disso, nos dois gráficos podemos visualizar que o solvente acetona teve o melhor resultado.

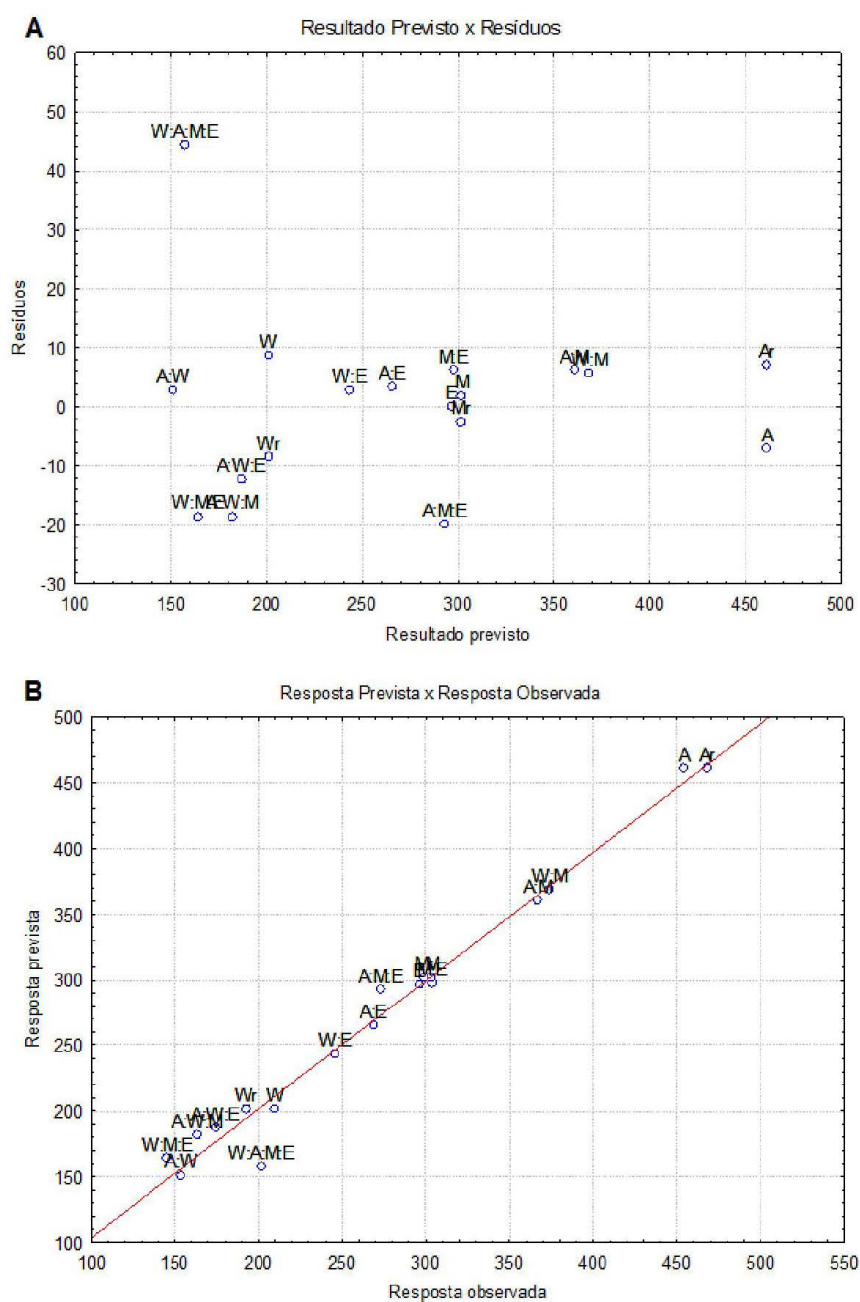


FIGURA 9 A, B– GRÁFICOS DE DIAGNÓSTICO DO MODELO ESPECIAL CÚBICO REDUZIDO PARA RESPOSTA TEOR DE FLAVONOIDES

A FIGURA 10, mostra as curvas de nível obtidas com a utilização do modelo especial cúbico reduzido. Assim como na resposta anterior, o solvente etanol foi igualado a 25% para simplificar e representar em apenas duas

dimensões a superfície de resposta. Os melhores resultados foram obtidos entre os solventes acetona e metanol e o solvente puro acetona.

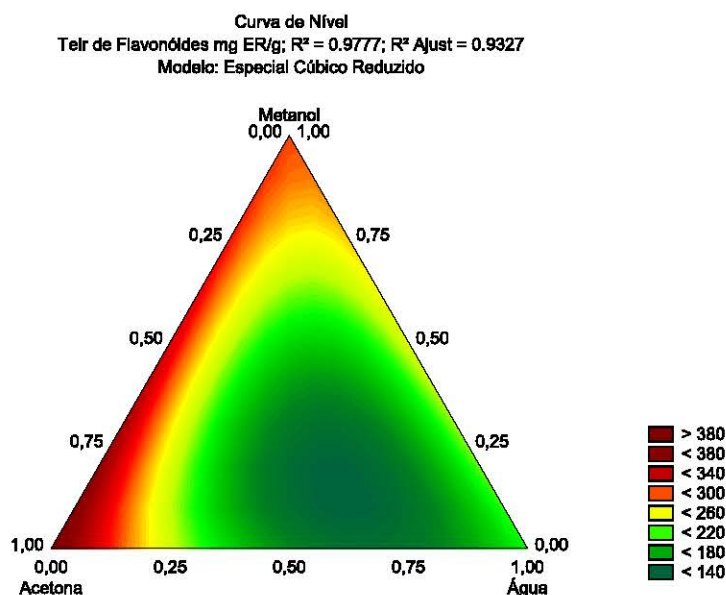


FIGURA 10 - CURVA DE NÍVEL PARA O MODELO CÚBICO ESPECIAL REDUZIDO PARA RESPOSTA TEOR DE FLAVONOIDE.

5.3 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

De acordo com a metodologia descrita, o doseamento do teor de fenólicos totais usou como padrão o ácido gálico. E a partir das várias soluções de concentrações diferentes foi obtida uma curva de calibração (FIGURA 11) relacionando a concentração do extrato com absorvância obtida pelo método. Com base nesses valores do gráfico foi possível a obtenção da equação da reta. Equação que foi usada para expressar os valores obtidos pelo experimento em miligramas de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

Os resultados dos experimentos expressos em miligramas equivalente de ácido gálico foram adicionados no programa de estatística com a finalidade de se obter as médias de cada extrato e também o desvio padrão atribuído as replicatas (TABELA 5).

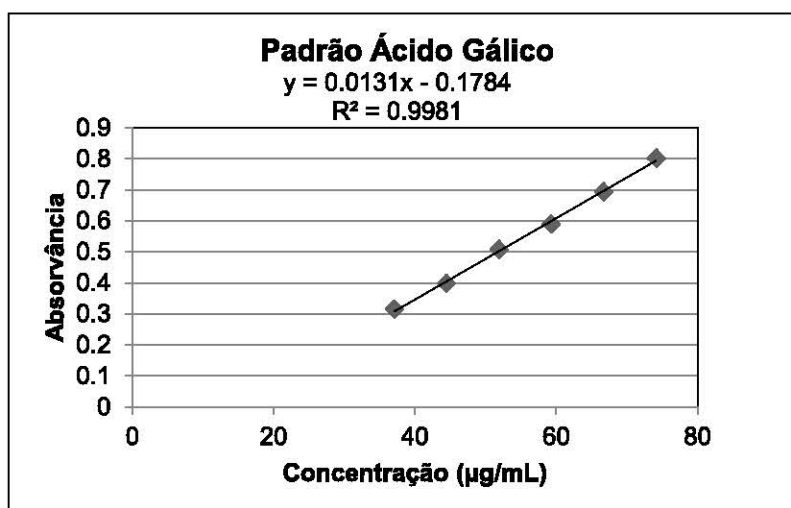


FIGURA 11 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO ÁCIDO GÁLICO E EQUAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.

As médias encontradas variam desde o maior valor encontrado no solvente puro água de $774,39 \pm 2,81$ mg EAG/g, até o menor valor encontrado no solvente puro acetona de $553,95 \pm 8,02$ mg EAG/g. A média global foi igual a $619,04 \pm 57,62$ mg EAG/g.

Com relação ao ajuste do modelo para a superfície de resposta, foram testados todos os modelos e somente o modelo linear se mostrou significativo e sem falta de ajuste com valor de significância igual a 0,05. Assim o modelo escolhido foi o linear com valor de $F = 11,03$, ou seja, somente 0,006% de chance da significância ser por causa do ruído e com valor de $F = 0,64$ para o teste de falta de ajuste, ou seja, a probabilidade desse valor ser atribuído ao ruído é de 74,74% (TABELA 6). O valor encontrado para o teste de falta de ajuste é muito alto, de acordo com o programa os valores de probabilidade devem estar abaixo de 10%, necessitando da confirmação do ajuste do modelo pelo gráfico “Resultado Previsto X Resultado Observado”.

O coeficiente ajustado de R^2 é de 0,639 para o modelo e o máximo que o R^2 poderia explicar é 0,703. O valor da precisão adequada de 9,410 indica que o modelo pode ser usado para percorrer a superfície de resposta. O R^2 previsto é igual a 0,491, esse valor segundo a análise do programa está em concordância com o valor ajustado de R^2 .

TABELA 5 - DESIGN DE MISTURA COM 4 FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 mL; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.

	Média mg EAG/g	Desvio Padrão	N	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
E	563,95	3,41	3	555,49	572,42
M:E	592,12	3,74	3	582,83	601,41
M	619,52	3,07	3	611,88	627,16
W:M:E	687,30	4,25	3	676,75	697,85
W:E	661,59	7,39	3	643,22	679,95
W:M	616,08	7,40	3	597,69	634,46
W	774,39	2,81	3	767,42	781,35
A:W:M:E	669,33	2,67	3	662,71	675,95
A:M:E	557,18	3,26	3	549,09	565,27
A:W:E	669,74	6,94	3	652,49	686,99
A:W:M	663,35	1,63	3	659,31	667,39
A:E	579,44	1,07	3	576,79	582,10
A:M	607,48	5,03	3	594,99	619,97
A:W	689,69	9,63	3	665,77	713,60
A	553,95	8,02	3	534,03	573,87
Mr	612,41	2,22	3	606,90	617,92
Wr	675,34	8,31	3	654,69	695,99
Ar	576,93	4,40	3	566,00	587,86
Total	619,04	57,62	54		

E – etanol; M – metanol; W – água; A – acetona; r – replicata. Cnf.Limt - 95% e 95% - Limite de confiança inferior e superior de 95%.

TABELA 6 - ANOVA PARA O MODELO DE MISTURA LINEAR

Fonte de variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p (valor) Prob > F	
Model	157753,9	11	14341,3	23,9	0,0005	Signif.
Linear	67098,9	3	22366,3	37,3	0,0003	
Residual	3601,6	6	600,3			
Lack of Fit	3345,1	3	1115,0	13,0	0,0316	Não Signif.
Erro Puro	256,5	3	85,5			
Cor Total	58311,26	17				

Desv. Padrão	35,19	R ²	0,703
Média	631,66	R ² Ajust	0,639
C.V. %	5,57	R ² Pred	0,491
PRESS	29704,67	Precisão adequada	9,410

A equação gerada por esse modelo (equação 8) conta somente os componentes puros e não demonstra nenhum termo de interação com efeito sinérgico ou antagônico. O coeficiente de maior valor é o obtido com o solvente puro água e os demais coeficientes têm valores semelhantes.

(8)

$$\text{Teor de Fenólicos} = 582,50(\pm 20,60)A + 738,60(\pm 20,60)W + 611,78(\pm 20,60)M + 583,63(\pm 25,25)E$$

A FIGURA 12A mostra os resíduos distribuídos de forma aleatória e dessa forma não é possível a identificação de tendência nesses valores. A FIGURA 12B mostra que os resultados previstos em comparação com os observados têm uma variação significativa, principalmente com relação aos solventes água e água:metanol. Esse fato pode estar relacionado à falta termos de interação na equação que descreve o modelo ou a grande diferença entre a média do solvente água e de sua repetição.

A FIGURA 13 demonstra as curvas de nível de resposta obtidas com a utilização do modelo linear. O solvente etanol foi igualado a 25% para simplificar a representação gráfica da superfície de resposta em apenas duas dimensões. Os melhores resultados foram obtidos pelas misturas com maior proporção de água e o solvente puro água.

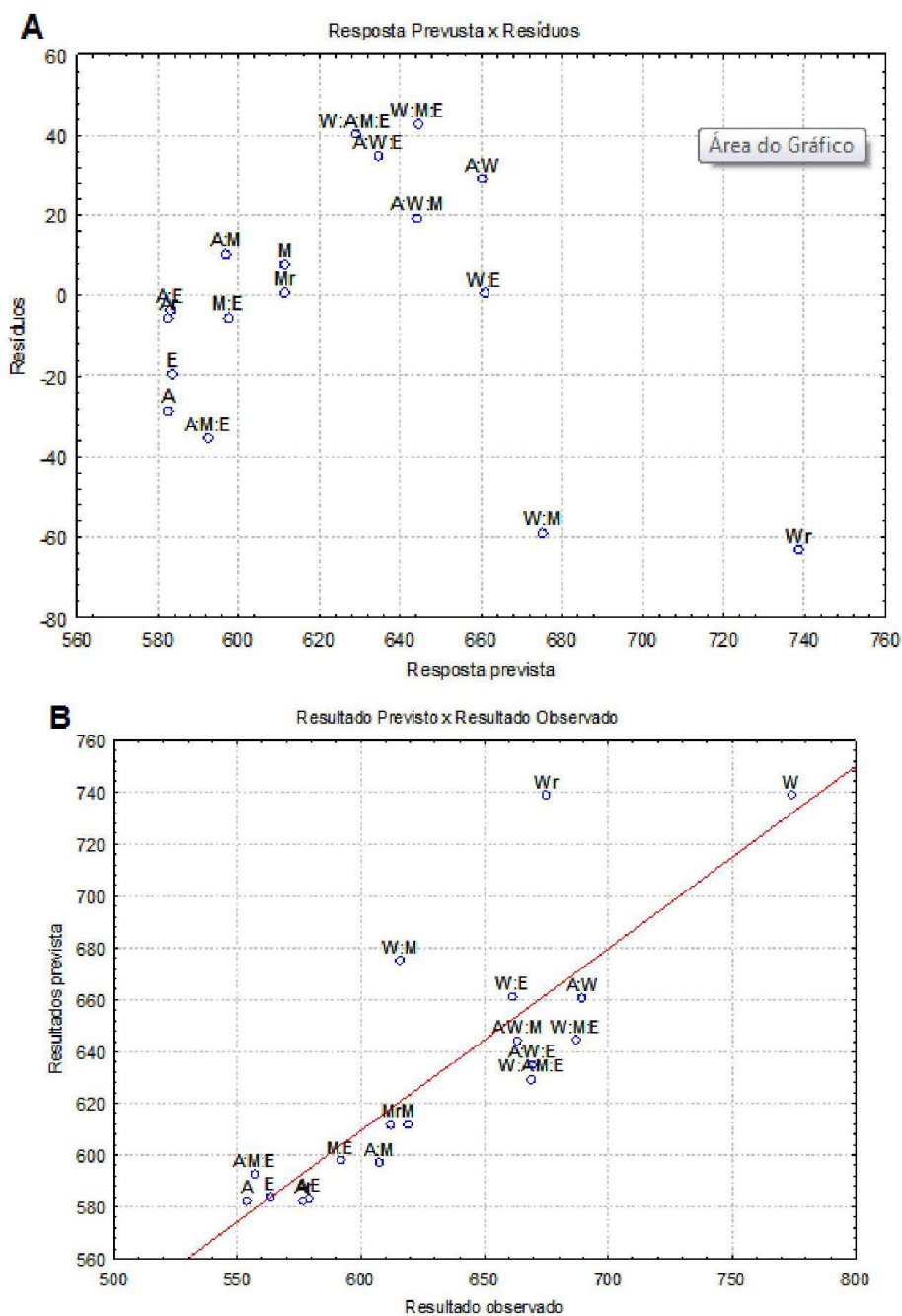


FIGURA 12 A, B - GRÁFICOS DE DIAGNÓSTICO DO MODELO LINEAR PARA RESPOSTA TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

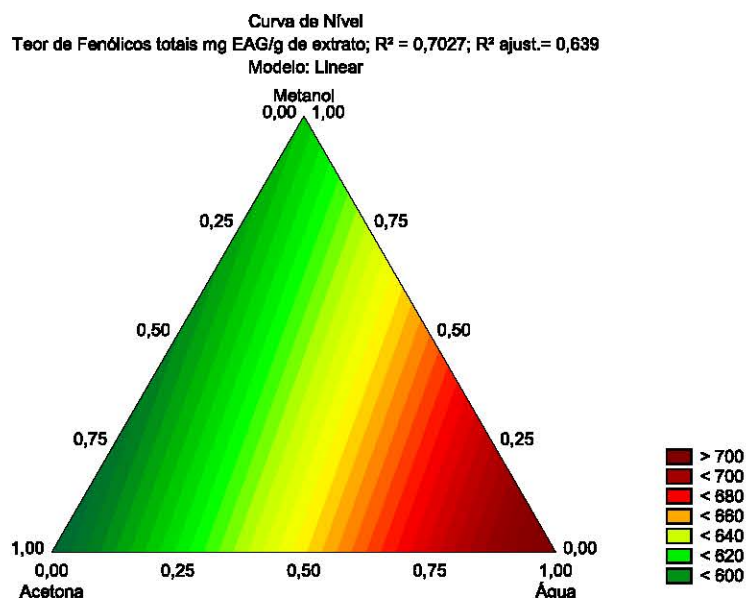


FIGURA 13 - CURVA DE NÍVEL PARA O MODELO LINEAR PARA RESPOSTA TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO

Nos ensaios de quantificação de atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, os padrões obtiveram valor de absorvância de: ácido ascórbico $0,586 \pm 0,009$, ácido gálico $0,928 \pm 0,007$, rutina $0,253 \pm 0,002$ e quercetina $0,501 \pm 0,004$. O maior valor de absorvância e consequentemente o maior valor de atividade antioxidante foi encontrado no padrão ácido gálico e esse foi considerado como atividade antioxidante de cem por cento (100%) com a finalidade de calcular a porcentagem antioxidante expressa em ácido gálico de cada amostra.

A TABELA 7 contém a média da triplicata de cada amostra, assim como o desvio padrão de cada uma delas. Os melhores resultados foram encontrados nas extrações binária água:etanol e quaternária acetona:água:metanol:etanol, com valores de $57,13 \pm 1,02$ e $56,60 \pm 0,57$ %, respectivamente. Os piores resultados foram encontrados com o solvente puro

água (replicata) $41,88 \pm 0,56$ % e com a mistura ternária acetona:metanol:etanol com $40,45 \pm 0,22$ %.

TABELA 7 – DESIGN DE MISTURA COM 4 FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: FOSFOMOLIBDÊNIO (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 mL; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.

	Média Capacidade Antioxidante %	Desvio Padrão	N	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
E	44,86	0,39	3	43,90	45,83
M:E	47,06	0,49	3	45,84	48,27
M	49,27	1,14	3	46,44	52,09
W:M:E	54,51	0,59	3	53,04	55,99
W:E	57,13	1,02	3	54,60	59,67
W:M	50,17	1,02	3	47,63	52,71
W	45,20	1,12	3	42,41	47,98
A:W:M:E	56,60	0,57	3	55,18	58,01
A:M:E	40,45	0,22	3	39,91	40,99
A:W:E	53,30	1,74	3	48,98	57,63
A:W:M	50,01	1,25	3	46,90	53,12
A:E	47,39	1,13	3	44,57	50,21
A:M	49,25	0,43	3	48,17	50,32
A:W	53,69	0,99	3	51,24	56,14
A	43,53	1,45	3	39,93	47,13
Mr	46,28	3,08	3	38,62	53,93
Wr	41,88	0,56	3	40,50	43,26
Ar	48,20	0,25	3	47,58	48,81
Total	48,82	4,83	54		

E – etanol; M – metanol; W – água; A – acetona; r – replicata. Cnf.Limt - 95% e 95% - Limite de confiança inferior e superior de 95%.

Nos testes para escolha do modelo para superfície de resposta foram testados todos os modelos e nenhum deles foi significativo e todos foram insignificantes ao teste de falta de ajuste. Entretanto o modelo quadrático reduzido foi significativo e sem falta de ajuste, ou seja, com a retirada de termos não significantes no nível de significância de 0,05 o modelo está de acordo com o esperado.

O modelo quadrático reduzido teve valor de $F=5,76$, com apenas 0,61% de chance do valor ser em decorrência do ruído. Já para o teste de falta de ajuste, o modelo teve $F=1,53$, com 39,64% de chance desse valor ser atribuído ao ruído (TABELA 8). E assim como no experimento anterior, esse valor esta

acima do esperado e o ajuste deve ser confirmado pelo gráfico “Resultado Previsto X Resultado Observado”.

TABELA 8 - ANOVA PARA O MODELO DE MISTURA QUADRÁTICO REDUZIDO

Fonte de variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p (valor) Prob > F	
Model	279,8	5	56,0	5,8	0,0061	Signif.
Linear Mixture	6,5	3	2,2	0,2	0,8777	
AW	79,1	1	79,1	8,1	0,0145	
WM	188,4	1	188,4	19,4	0,0009	
Residual	116,5	12	9,7			
Lack of Fit	95,7	9	10,6	1,5	0,3994	Não Signif.
Erro Puro	20,8	3	6,9			
Cor Total	396,4	17				

Desv. Padrão	3,12	R²	0,706
Média	48,82	R² Ajust	0,583
C.V. %	6,38	R² Pred	0,456
PRESS	215,52	Precisão adequada	7,759

O coeficiente ajustado de R^2 é de 0,583 para o modelo quadrático reduzido e o máximo que o R^2 pode explicar é 0,706. Com relação à precisão adequada, o modelo tem valor de relação sinal ruído de 7,759, indicando que o modelo pode ser usado para percorrer a superfície. O valor de R^2 previsto esta de acordo com o valor encontrado de R^2 ajustado.

A equação (9) atribuída a esse modelo conta com seis termos e apenas dois deles são significativos. O maior valor de coeficiente é encontrado na mistura binária água:metanol, seguido da mistura binária acetona:água. Ambas as misturas têm interação de efeito sinérgico.

(9)

$$\begin{aligned} \% \text{ Antioxidante} = & 45,99(\pm 1,96)A + 44,59(\pm 2,08)W + 49,01(\pm 1,83)M \\ & + 44,64(\pm 2,51)E + 34,64(\pm 12,14)AW + 55,73(\pm 12,65)WM \end{aligned}$$

Na FIGURA 14A podemos observar uma distribuição aleatória dos resíduos, sem aparente tendência de resultados. A FIGURA 14B mostra a

relação entre a resposta observada e a prevista com uma aparente variação. Essa variação pode estar diretamente relacionada à falta de mais termos significativos de interação.

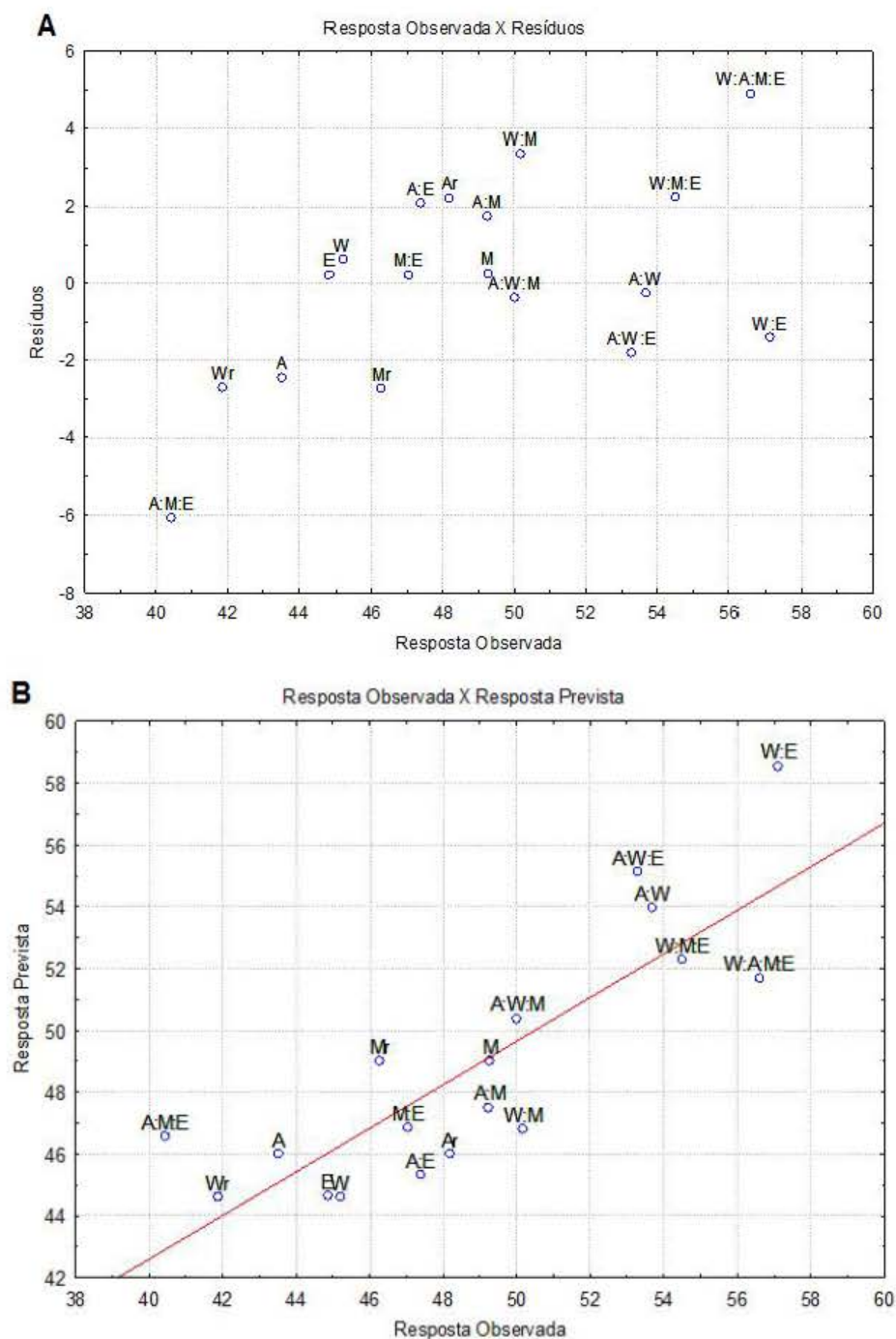


FIGURA 14 A, B – GRÁFICOS DE DIAGNÓSTICO DO MODELO QUADRÁTICO REDUZIDO PARA RESPOSTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO.

A curva de nível da FIGURA 15, obtida com o modelo quadrático reduzido, demonstra as respostas previstas para cada proporção do líquido extrator. O solvente etanol foi igualado a 25% para simplificar a representação gráfica da superfície de resposta em apenas duas dimensões. Os melhores resultados foram obtidos pelas misturas entre os solventes acetona e água, nas proporções ente 1/2:1/2 e 1/4:3/4.

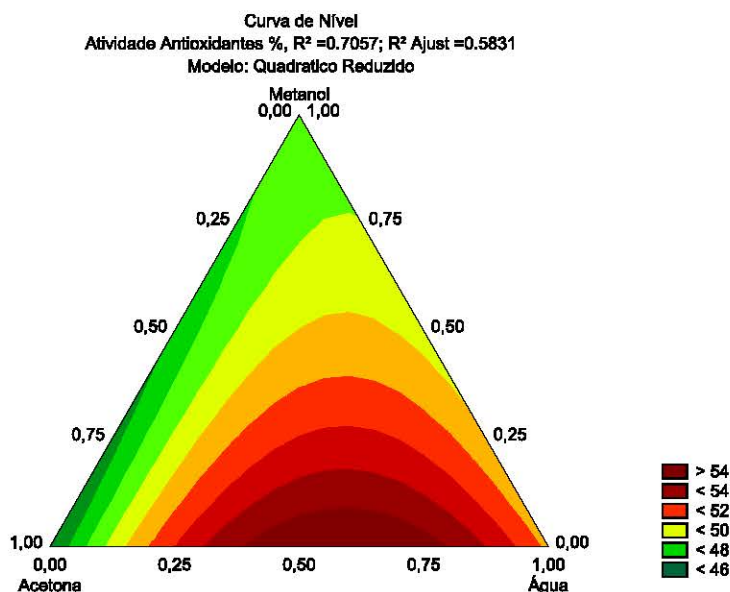


FIGURA 15 - CURVA DE NÍVEL PARA O MODELO QUADRÁTICO REDUZIDO PARA RESPOSTA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, MÉTODO FOSFOMOLIBDÊNIO.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO DPPH•

Os gráficos da curva padrão de DPPH•, das amostras e dos padrões são apresentados no final do trabalho (APÊNDICE 1). E na tabela estão listados os resultados das amostras (expressos em IC_{50}), a equação da reta correspondente e o coeficiente de determinação R^2 .

Os valores do IC_{50} para as amostras (TABELA 9) tiveram média de $153,16 \pm 31,80 \mu\text{g/mL}$, variando desde o melhor valor (menor IC_{50}) encontrado na mistura ternária acetona:água:metanol de $IC_{50} = 95,74 \mu\text{g/mL}$, até os piores resultados encontrados na replicata do solvente puro acetona e na mistura quaternária acetona:água:metanol:etanol, com valores de IC_{50} igual a 201,10 e

201,30 µg/mL, respectivamente. Na TABELA 10, temos o valor de IC₅₀ para os padrões positivos, o melhor resultado foi do padrão ácido ascórbico com IC₅₀ igual a 8,56 µg/mL e o pior resultado foi o do padrão rutina com IC₅₀ com valor de 40,40 µg/mL.

TABELA 9 - DESIGN DE MISTURA COM 4 FATORES (VARIÁVEIS INDEPENDENTES); ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: RADICAL DPPH• (VARIÁVEL DEPENDENTE); VOLUME TOTAL= 200 mL; TRIPLICATA= 54 CORRIDAS.

	IC ₅₀ : µg/mL	Equação da reta	R ²	N
E	176,50	Y = -0,2262x +89,925	0,9908	3
M:E	118,61	Y = -0,2874x +84,088	0,9898	3
M	145,40	Y = -0,2683x +89,012	0,9929	3
W:M:E	124,32	Y = -0,3411x +92,406	0,9964	3
W:E	169,48	Y = -0,3145x +103,03	0,9905	3
W:M	173,01	Y = -0,2994x +101,80	0,9886	3
W	138,32	Y = -0,3147x +93,528	0,9953	3
A:W:M:E	201,30	Y = -0,2363x +97,568	0,9974	3
A:M:E	172,05	Y = -0,2182x +87,541	0,9985	3
A:W:E	117,83	Y = -0,4064x +97,886	0,9958	3
A:W:M	95,74	Y = -0,4884x +96,759	0,9958	3
A:E	161,43	Y = -0,2566x +91,423	0,9976	3
A:M	149,42	Y = -0,2478x +87,027	0,9979	3
A:W	103,01	Y = -0,3843x +89,585	0,9968	3
A	179,68	Y = -0,2146x +88,56	0,9962	3
M r	181,96	Y = -0,2662x +99,437	0,9967	3
W r	147,77	Y = -0,3071x +95,381	0,9977	3
A r	201,10	Y = -0,2335x +96,958	0,9925	3
Média	153,16			
Desv. Pad.	31,80			

E – etanol; M – metanol; W – água; A – acetona; r - replicata

TABELA 10 – VALORES DE IC₅₀ OBTIDOS PARA OS PADRÕES E EQUAÇÃO DA RETA.

Padrões	IC ₅₀ : µg/mL	Equação da reta	R ²	N
Ác. Gálico	14,41	Y = -3,1684x +95,673	0,9918	3
Rutina	40,40	Y = -1,1457x +96,292	0,9957	3
Quercetina	14,43	Y = -3,1484 +95,446	0,9976	3
Ác. Ascórbico	8,56	Y = -4,9877x +92,685	0,9999	3

No ajuste ao modelo de regressão para a superfície de resposta, nenhum dos modelos foi significativo com o valor de alfa igual a 0,05. E os modelos linear e quadrático se mostraram ajustados, ou seja, insignificância ao teste de falta de ajuste. Mesmo com a retirada de termos insignificantes e mudanças no valor de alfa até o valor de 0,1, o modelo linear, quadrático e especial cúbico não apresentaram significância. Dessa forma, a sugestão adotada do programa é que a média seja o melhor indicativo resposta do que os demais modelos.

Para o modelo média, o único parâmetro que se mantém é o teste de falta de ajuste. Com o valor de F para o teste igual a 3,69, o modelo mostrou insignificância para o mesmo, existindo apenas 15,45% de chance desse valor ser em decorrência do ruído (TABELA 11).

TABELA 11 - ANOVA PARA O MODELO MÉDIA

Fonte de variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F	p (valor) Prob > F	
Model	0,0	0				
Residual	17188,1	17	1011,1			
Lack of Fit	16245,7	14	1160,4	3,7	0,1545	Não Signif.
Erro Puro	942,4	3	314,1			
Cor Total	396,4	17				
Desv. Padrão	31,80	R²		0,000		
Média	153,16	R² Ajust		0,000		
C.V. %	20,76	R² Pred		-0,121		
PRESS	19269,72	Precisão adequada				

O coeficiente ajustado de R^2 e o máximo que R^2 pode explicar são iguais a zero, ou seja o modelo, média não é capaz de percorrer superfície de resposta.

5.6 OTIMIZAÇÃO

O programa Design-Expert®, usa a metodologia para otimização de resposta numérica e para isso, combina as várias respostas em uma única resposta composta. O método de combinar respostas é o chamado “*desirability function*” e é comum em pacotes computacionais destinados ao design de misturas. O valor atribuído ao “*desirability*” pode variar de 1 (desejável, satisfatório ou aceito) até 0 (indesejável, insatisfatório ou não aceito) (SMITH, 2005).

A primeira parte da análise dos resultados é a definição dos critérios levados em consideração para obtenção da mistura otimizada. Essa definição é dividida em duas partes, a escolha da relativa importância de cada componente ou resposta, variando de 1 a 5; e a escolha do objetivo da otimização, podendo ser “não utilizada”, “maximizada”, “minimizada”, “no alvo” ou “na faixa de”.

Com relação à atribuição da relativa importância, às respostas resíduo seco e teor de flavonoides foi atribuído o valor de 5, pois os dois resultados tem valor de coeficiente de determinação ajustado e máximo, maiores que as demais repostas. Também, os modelos ajustados a essas respostas têm um número maior de termos significativos. E mesmo com valor do coeficiente de determinação previsto negativo, o gráfico “Resposta Observada X Resposta Prevista” mostra uma baixa dispersão dos pontos em relação à linha central.

Para as respostas teor de fenólicos e atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio, o valor atribuído às duas respostas foram 4. O valor se deve ao fato de que o modelo ajustado a esses termos é de menor ordem e contém um número menor de termos significativos, sendo linear e quadrático reduzido respectivamente. Além disso, o coeficiente de determinação ajustado e máximo estão abaixo das repostas anteriores. E mesmo o valor do coeficiente de determinação sendo positivo e em concordância com o ajustado, no gráfico “Resposta Observada X Resposta Prevista” é observada uma dispersão dos valores em relação à linha central.

Na determinação do objetivo da otimização, apenas a resposta antioxidante pelo método DPPH• seria minimizada, mas ela não foi utilizada. Para as demais respostas foi escolhido o modo maximizar resposta.

Para os componentes da mistura, não foi necessário à escolha de uma relativa importância de cada solvente ou objetivo da otimização, pois todos foram mantidos na faixa de 0 a 200 mL, assim como na construção do modelo.

A seleção de uma relativa importância e/ou minimizar/maximizar algum componente, pode ser usada para deslocar a resposta a misturas com menor custo.

Após determinados os critérios ou restrições (TABELA 12), o programa faz uma seleção das melhores misturas de acordo com os critérios que determinam o valor de “desirability”. E dessa forma foram selecionadas 6 misturas com diferentes proporções, variando o valor de “desirability” de 0,576, encontrado na mistura água:metanol (90,18:109,82 mL), até 0,456, encontrado na mistura acetona:água (152,58:47,42 mL) (Tabela 13).

TABELA 12 – RESTRIÇÕES DEFINIDAS PARA A OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA DE MÚLTIPLAS RESPOSTAS

Restrições:						
Nome	Objetivo	Menor Limite	Maior Limite	Menor Peso	Menor Peso	Importância
Acetona	"na faixa"	0,00	200,00	1	1	3
Água	"na faixa"	0,00	200,00	1	1	3
Metanol	"na faixa"	0,00	200,00	1	1	3
Etanol	"na faixa"	0,00	200,00	1	1	3
Resíduo Seco	"maximize"	89,32	175,63	1	1	5
Teor Flavonoide	"maximize"	145,00	468,00	1	1	5
Teor de Fenólicos	"maximize"	553,95	774,39	1	1	4
Fosfomolibdênio	"maximize"	40,45	57,13	1	1	4

TABELA 13 – SOLUÇÕES ENCONTRADAS PARA A OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA DE MÚLTIPLAS RESPOSTAS

Soluções:									
	A	W	M	E	Res. Seco	Teor Flavo.	Teor Fenóis	Fosfomolibd.	Desirability
1	*	90,18	109,82	*	149,14	372,30	668,96	47,02	0,576
2	*	90,91	*	109,09	149,95	247,57	654,07	58,44	0,553
3	90,51	*	109,49	*	170,33	352,68	598,53	47,64	0,505
4	100	*	100	*	170,27	360,07	597,14	47,50	0,504
5	148,35	45,28	*	6,38	140,09	264,70	617,88	51,85	0,457
6	152,58	47,42	*	*	137,02	268,62	619,51	51,92	0,456

A – acetona; W - água; M – metanol; E – etanol; Res. – resíduo; Flavo. – flavonoides; Fosfomolibd. – fosfomolibdênio.

Os resultados apontam que as misturas binárias obtiveram melhor resultado, principalmente nas misturas entre água:metanol e água:etanol.

Apenas a mistura ternária entre acetona:metanol:etanol está entre as 6 melhores soluções.

A única solução prevista na matriz de planejamento e na solução de otimização foi a mistura acetona:metanol 100:100 (mistura 4 da TABELA 13). Com a finalidade de comparar os resultados previstos com os observados, foi criada uma tabela com os resultados previstos para a mistura de número quatro e os observados na mistura de mesma proporção obtida na construção do design. E a partir dos dados da TABELA 14 é possível observar a pequena variação entre o resultado previsto e o observado, com variação abaixo dos 5%, o que mostra um bom ajuste entre o observado e previsto.

TABELA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE O VALOR PREVISTO E O OBSERVADO PARA A SOLUÇÃO SUGERIDA APÓS OTIMIZAÇÃO

Soluções:				
MISTURA	Resíduo Seco	Teor Flavonoide	Teor de Fenólicos	Fosfomolibdênio
Prevista (A:M)	170,26	360,07	597,14	47,50
Observada (A:M)	164,31	366,00	607,48	49,25
Variação %:	3,62%	-1,62%	-1,70%	-3,55%

A – acetona; M- metanol

5.7 ANÁLISE DE PERFIL CROMATOGRÁFICO

A metodologia utilizada para a obtenção do perfil cromatográfico foi desenvolvido com base no trabalho realizado por Rodrigues (2007). Foram realizados diversos ajustes quanto à fase móvel, gradiente, solução diluente e comprimento de onda (dados não apresentados) até obter um cromatograma que permitisse a visualização de diversos picos e a comparação dos diferentes extratos de *E. badjensis*, sendo utilizado como uma ferramenta analítica.

A obtenção de perfil cromatográfico como uma forma de comparação entre extratos brutos obtidos utilizando diferentes líquidos extratores, resultaram em cromatogramas complexos. Normalmente, é possível utilizar como resposta o número de picos detectados (e sua área) em cada

cromatograma como uma alternativa de analisar a influência do líquido extrator no processo de extração de diferentes grupos químicos.

Ao analisar os cromatogramas obtidos após a injeção dos diferentes extratos, observou-se que a diferença no número de picos entre as amostras é baixa, não sendo possível a utilização deste parâmetro como uma resposta a ser analisada pela metodologia de superfície de resposta. Além disto, até o momento, não foi identificado um composto ou grupo de compostos de interesse para direcionar a análise deste parâmetro.

Desta forma, a avaliação do perfil cromatográfico foi utilizada como uma ferramenta para acompanhar o processo de extração, sendo avaliada a presença dos diferentes picos nas amostras.

Conforme apresentado na FIGURA 16, houve diferença no perfil cromatográfico por CLAE-DAD ao utilizar solvente puro como líquido extrator. O perfil do solvente água foi o que apresentou maior diferença ao comparar com os solventes puros metanol, etanol e acetona, não sendo detectado a presença de picos a partir de 50 min de corrida em 280 nm. Porém, foi observado a presença do pico 1 ($T_r = 10,11$ min) no solvente água, o qual está ausente nos outros solventes.

Nas misturas binárias (FIGURA 17), foi observado que os perfis cromatográficos dos diferentes extratos são semelhantes para a maioria dos picos. Uma das diferenças encontradas diz respeito ao pico 1, que nas misturas binárias contendo água, este pico aparece com intensidade menor, quando comparado ao solvente puro água. Por outro lado, nas misturas que não apresentam água em sua composição, a detecção deste pico é dificultada, pois sua intensidade está próxima ao do ruído.

A mistura binária metanol:acetona foi uma das seis misturas selecionadas através da metodologia de otimização, considerando como fator de resposta resíduo seco, teor de flavonoides, teor de fenóis, atividade antioxidante (fosfomolibdêmico). Seu perfil cromatográfico, quando comparado com os demais cromatogramas de misturas binárias, apresentou picos com intensidade semelhantes ao da mistura binária metanol:etanol (picos de maior intensidade).

Nas misturas ternárias (FIGURA 18), da mesma forma que foi observado nas misturas anteriores, a principal diferença encontrada nos cromatogramas

está relacionada quanto a presença e a intensidade do pico 1, sendo este levemente mais intenso nas misturas contendo água, porém próximo ao ruído. Na mistura quaternária, este efeito também foi observado.

Estes resultados demonstraram que mesmo utilizando diferentes solventes, o perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD foi semelhante, com exceção para o solvente puro água. Além disto, a simples comparação visual dos cromatogramas, analisando o número e a intensidade dos picos, não é suficiente para diferenciar as amostras utilizando as demais misturas. Entretanto, o desenvolvimento desta metodologia permite que ela seja utilizada como uma ferramenta de acompanhamento em etapas posteriores, como de fracionamento e isolamento de compostos.

As técnicas estatísticas utilizadas neste trabalho servem como ferramentas para a otimização do processo de extração, metodologias de análise, entre outros, apresentando como vantagem o baixo custo quando comparado a estas técnicas se realizadas de forma empírica, e um elevado número de informações que auxiliam na interpretação dos processos envolvidos nas respostas, sejam elas de forma isolada ou em conjunto. Além disto, permite um direcionamento racional de trabalhos futuros.

Com base nas informações obtidas até o momento para a espécie *Eucalyptus badjensis*, torna-se importante a identificação de seus metabólitos especiais, associando-os a atividades farmacológicas de interesse. Desta forma, esta técnica estatística poderá ser aplicada para avaliar a influência dos diferentes líquidos extratores e suas misturas na extração de marcadores químicos da espécie.

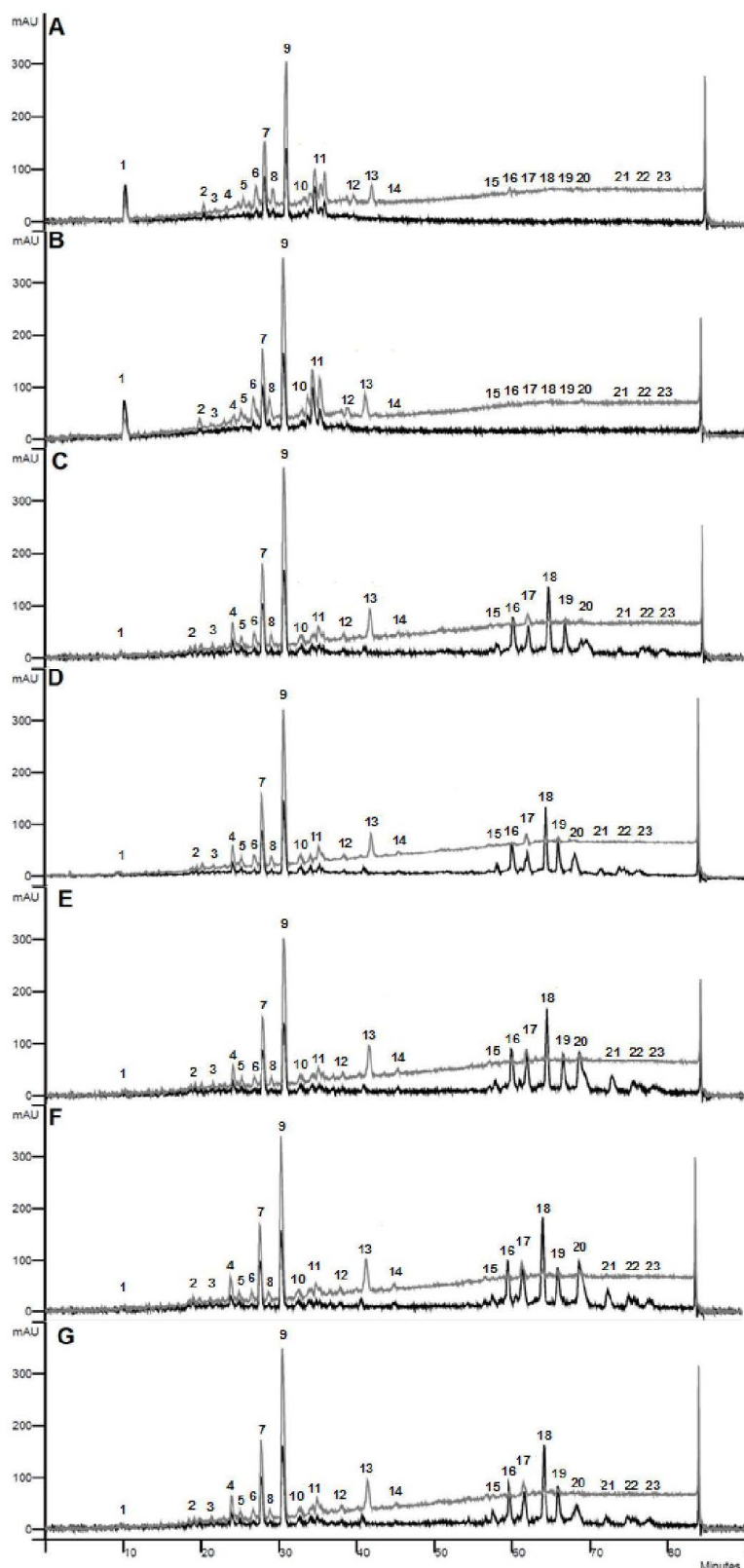


FIGURA 16 – PERFIL CROMATOGRAFÍCO POR MÉTODO ANALÍTICO (CLAE-DAD), EM 240 nm (CINZA) e 280 nm (PRETO) DE EXTRATOS OBTIDOS COM SOLVENTES PUROS. A - água; B - água (replicata); C - metanol; D - metanol (replicata); E - acetona; F - acetona (replicata); G - etanol.

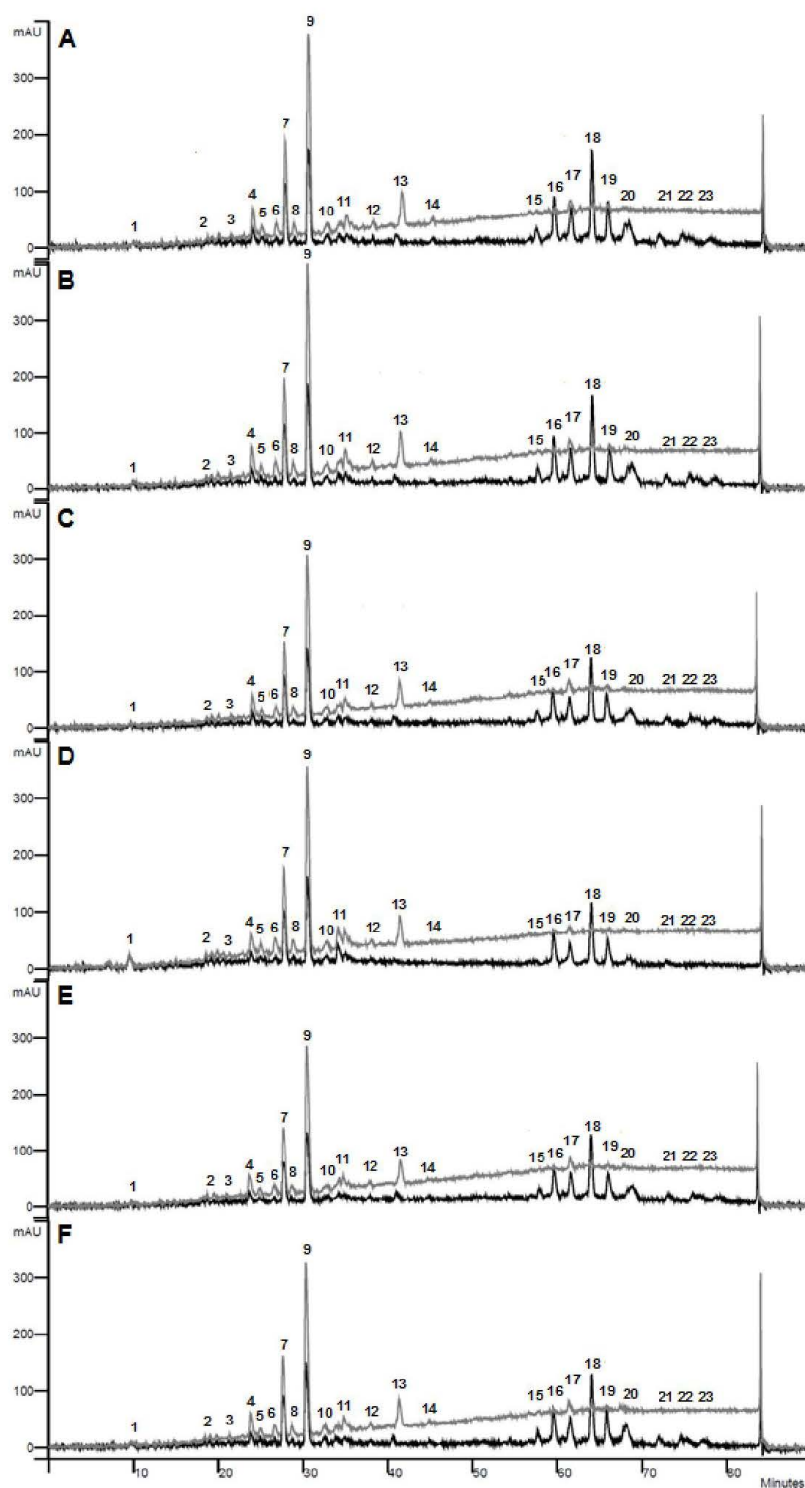


FIGURA 17 - PERFIL CROMATOGRÁFICO POR MÉTODO ANALÍTICO (CLAE-DAD), EM 240 nm (CINZA) E 280 nm (PRETO) DE EXTRATOS OBTIDOS COM MISTURAS BINÁRIAS. A – metanol:etanol; B – metanol:acetona; C – acetona:etanol; D – água:acetona; E – água:etanol; F – metanol:água.

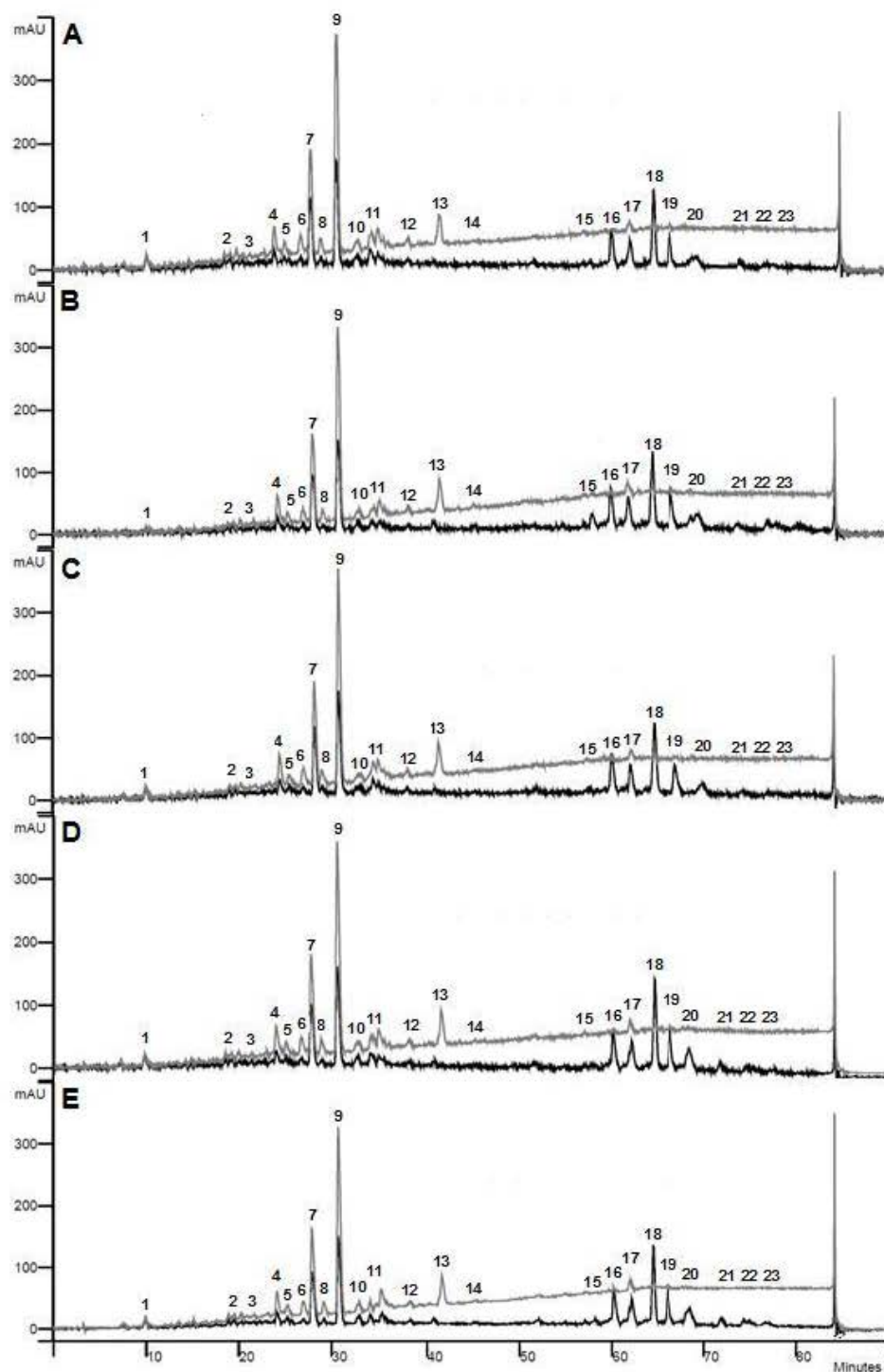


FIGURA 18 - PERFIL CROMATOGRÁFICO POR MÉTODO ANALÍTICO (CLAE-DAD), EM 240 nm (CINZA) E 280 nm (PRETO) DE EXTRATOS OBTIDOS COM MISTURAS TERNÁRIAS E QUARTENÁRIA.

A – metanol:água:acetona; B – metanol:acetona:etanol; C – metanol:água:etanol; D – água:acetona:etanol; E – metanol:água:acetona:etanol.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi feita a análise comparativa dos solventes na extração de metabólitos especiais e atividade antioxidante das folhas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch através de design de misturas do tipo Simplex-Centróide e superfície de resposta.

Na primeira etapa foi avaliada a influência de quatro solventes no meio extrator nas respostas resíduo seco, teor de flavonoides, teor de fenólicos e atividade antioxidante pelo método do radical DPPH• e Fosfomolibidênio. Através desse estudo foi possível concluir que:

- Nas respostas teor de fenólicos e teor de flavonoides, os melhores resultados foram encontrados respectivamente nos solventes puros água e acetona. Nas demais respostas os melhores resultados foram encontrados em misturas binárias ou ternárias.
- Para análise de superfície, com exceção da resposta antioxidante pelo método do radical DPPH•, todas as demais respostas tiveram significância a um modelo de regressão sem demonstrar falta de ajuste. Dessa forma, foi possível a utilização de quatro variáveis para otimização dos componentes da mistura.

Na sequência encontrou-se a melhor proporção da(s) mistura(s) do solvente extrator por meio de otimização de múltiplas respostas. E foi possível concluir que:

- Foram encontradas e selecionadas seis soluções com diferentes proporções de acordo com o valor de “desirability”. Os melhores valores de “desirability” foram encontrados para a mistura água:metanol à 45,09% e água:etanol 45,45%.
- Cinco das seis misturas selecionadas são misturas binárias, apenas uma é ternária e nenhuma é solvente puro. Ou seja, a utilização de misturas no processo de extração é mais eficiente que o uso de solventes puros, quando a múltipla resposta é avaliada.

A última etapa foi o desenvolvimento da técnica analítica para avaliar as diferenças no perfil cromatográfico. E foi possível concluir que:

- Os parâmetros utilizados foram suficientes para demonstrar o perfil cromatográfico da planta. Entretanto não foi possível diferenciar as amostras pela presença ou ausência de picos cromatográficos e usa-las como resposta.
- Verificou-se a necessidade do isolamento e identificação de marcadores, ou grupos químicos de interesse. Possibilitando a validação do método e sua utilização como resposta na otimização da extração.

REFERÊNCIAS

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, abr. 2013.

AMAKURA, Y. *et al.* Constituents and their antioxidative effects in *Eucalyptus* leaf extract used as a natural food additive. **Food Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 47–56, maio 2002.

AMAKURA, Y. *et al.* Marker Constituents of the Natural Antioxidant *Eucalyptus* Leaf Extract for the Evaluation of Food Additives. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 5, p. 1060–1065, 2009.

ANTÔNIO, R. D. **Caracterização fitoquímica, morfoanatomia e atividades biológicas de *Eucalyptus badjensis* Beuzev. e Welch, Myrtaceae.** Dissertação de Mestrado. PPGCF. UFPR. p. 110, 2011.

BOX, G.; DRAPER, N. **Response surfaces, mixtures, and ridge analyses.** 2. ed. United States of America: Wiley, 2007. p. 857

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995.

BRASIL. **Farmacopéia brasileira.** 5. ed. , volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010. p. 523

BROOKER, I. Botany of the *Eucalyptus*. In: COPPEN, J. J. W. (Ed.). ***Eucalyptus: the genus Eucalyptus***. London: Taylor & Francis, 2002. v. 1.

BROPHY, J. J.; SOUTHWELL, I. A. *Eucalyptus* chemistry. In: COPPEN, J. J. W. (Ed.). ***Eucalyptus: the genus Eucalyptus***. London: Taylor & Francis, 2002. v. 1p. cap. 5.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia.** Zaragoza: Acribia, 1991. p. 594

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design — Varimax factor optimization for selective compound extraction from plant material Patr '. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 48–55, 2008.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Eds.). **FARMACOGNOSIA da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. v. 1p. 519–535.

CLARINGBOLD, P. Use of the simplex design in the study of joint action of related hormones. **Biometrics**, v. 11, n. 2, p. 174–185, 1955.

CLENILSON MARTINS RODRIGUES. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. Universidade Estadual Paulista, 2007.

COENEGRACHT-LAMERS, P. M. J. C. H. J. M. A. K. S. P. J. M. A Chemometric Investigation of the Selectivity of Multisolvent Mobile Phase Systems in RP-HPLC. **Chromatographia**, v. 27, n. 2/3, p. 135–141, 1989.

CONDE, E.; CADAHÍA, E.; GARCÍA-VALLEJO, M. C. Low molecular weight polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 4, p. 186–193, 1997.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 241–246, 2009.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York ; Guildford: Columbia University Press, 1981. p. 1262

CROZIER, A.; JAGANATH, I.; CLIFFORD, M. **Phenols, polyphenols and tannins: an overview**. 1. ed. Oxford: p. 372

DAHLGREN, R.; THORNE, R. F. The Order Myrtales: Circumscription, Variation, and Relationships. **Annals of The Missouri Botanical Garden**, v. 71, n. 3, p. 633–699, 1984.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, n. 15, p. 7313–7352, 2010.

DUDONNÉ, S. *et al.* Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1768–1774, 2009.

EVANS, W. C.; TREASE, G. E. P.; EVANS, D. **Trease and Evans pharmacognosy**. 15th ed. / ed. Edinburgh ; New York: W.B. Saunders, 2002.

FAN, X. *et al.* Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, p. 217–224, 2006.

FISHER, R. The analysis of variance with various binomial transformations. **Biometrics**, v. 10, n. 1, p. 130–139, 1954.

GARCIA, L. M. Z. **ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO EFEITO DO SOLVENTE NA ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS FOLHAS DE *Mikania laevigata* Sch. Bip. POR MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**. UEL, 2009.

GOULD, KEVIN S.; LISTER, C. Flavonoid Functions in Plants. In: **Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications**. 1. ed. Nova York: Taylor & Francis, 2006. v. 1p. 397–441.

HIGA, R. C. V.; HIGA, A. R.; ALVES, E. C. Comportamento de Progenies de *Eucalyptus badjensis* Beuzev . & Welch em Dois Locais da Região Sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 45, p. 89–97, 2002a.

HIGA, R. C. V.; HIGA, A. R.; ALVES, E. C. ***Eucalyptus badjensis* Beuzev. & Welch Espécie Potencial para Produção de Madeira e Óleos Essenciais no Sul do Brasil**. 2002b.

JOHSON, L. A. S.; BRIGGS, B. G. Myrtales and Myrtaceae - A Phylogenetic Analysis. **Annals of The Missouri Botanical Garden**, v. 71, n. 3, p. 700–756, 1984.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 7. ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1985. p. 777

KHANBABAE, K.; VAN REE, T. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 641–649, 2001.

KLEIJNEN, J. P. C. **Response Surface Methodology**. Disponível em: <<http://www.ssrn.com/abstract=2395836>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

KONOSHIMA, T.; TAKASAKI, M. Chemistry and bioactivity of the non-volatile constituents of Eucalyptus. In: COPPEN, J. J. W. (Ed.). **Eucalyptus: the genus Eucalyptus**. London: Taylor & Francis, 2002. v. 1.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, jul. 2011.

LAMAISON, J. L.; CARNAT, A. Teneur en Principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poir.) DC. (Rosaceae). **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 65, n. 11, p. 315–320, 1990.

LI, B. *et al.* Quality evaluation of fingerprints of herbal medicine with chromatographic data. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, p. 69–77, 2004.
MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970. p. 354

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. **Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis**. Disponível em: <www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>. Acesso em: 20 ago. 2013.

MINUNNI, M.; BILIA, A. R. Biosensing Approach in Natural Product Research. In: COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. (Eds.). **BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS Detection, Isolation, and Structural Determination**. 2. ed. London: Taylor & Francis Group, 2008. v. 1p. 299–319.

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A Cultura do Eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. p. 111

MYERS, R.; ANDERSON-COOK, C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 3. ed. [s.l.] wiley, 2009. p. 1247

NAKASHIMA, T. **Étude phytochimique évaluation des activités antifongiques et antivirales de trois Verbenaceae: *Lippia alba* N. B. Brown, *Lippia multiflora* Mold., *Citharexylum myrianthum* Cham.** Toulouse, France: INP, 1993.

NIJVELDT, R. J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001.

OKAMURA, H. *et al.* Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 3, p. 557–561, 1993.

ONNI, A. A. S. G. L. *et al.* Differentiation of Species of the *Baccharis* Genus by HPLC and Chemometric Methods. **Analytical Sciences**, v. 19, p. 1013–1017, 2003.

PEREIRA, J. C. D. *et al.* **Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. v. 38p. 113

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–41, 1 maio 1999.

REIS, C.; ANDRADE, J. DE. Planejamento experimental para misturas usando cromatografia em papel. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 313–319, 1996.

SANTOS, S. DA C.; MELLO, J. C. P. DE. Taninos. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Eds.). **FARMACOGNOSIA da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. v. 1p. 615–656.

SCHEFFE, H. Experiments with mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B**, v. 20, n. 2, p. 344–360, 1958.

SCHEFFE, H. The simplex-centroid design for experiments with mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B**, v. 25, n. 2, p. 235–263, 1963.

SILVA, R. R. DA et al. Efeito de Flavonóides no Metabolismo do Ácido Araquidônico. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 35, n. 2, p. 127–133, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6^a. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. v. 1p. 467–495.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SMITH, W. **Experimental design for formulation**. Philadelphia: p. 367

SOUSA, C. M. DE M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, p. 351–355, 2007.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of separation science**, v. 30, n. 18, p. 3268–95, dez. 2007.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 60–64, 2004.

THOMPSON, W.; MYERS, R. Response surface designs for experiments with mixtures. **Technometrics**, v. 10, n. 4, p. 739–756, 1968.

TURNBULL, J. W.; BOOTH, T. H. Eucalypts in cultivation: an overview. In: **Eucalyptus: the genus Eucalyptus**. London: Taylor & Francis, 2002. v. 1p. cap. 3.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic Compound Biochemistry**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p. 276

WANG, P.-S.; FANG, J.-J. The Optimization of Medicine Formulation Using Mixture Experiments. **International MultiConference of Engineers and Computer Scientists**, v. 3, p. 1–6, 2010.

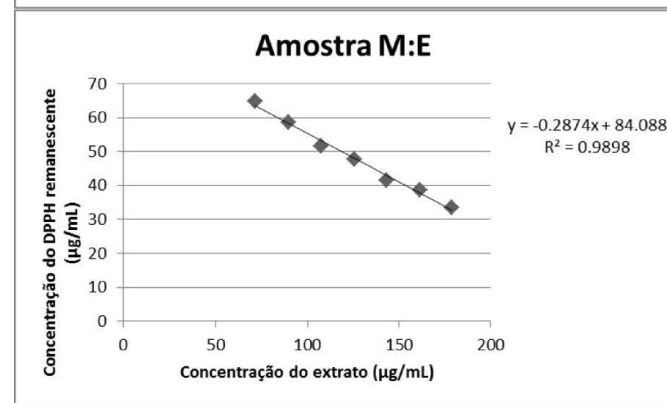
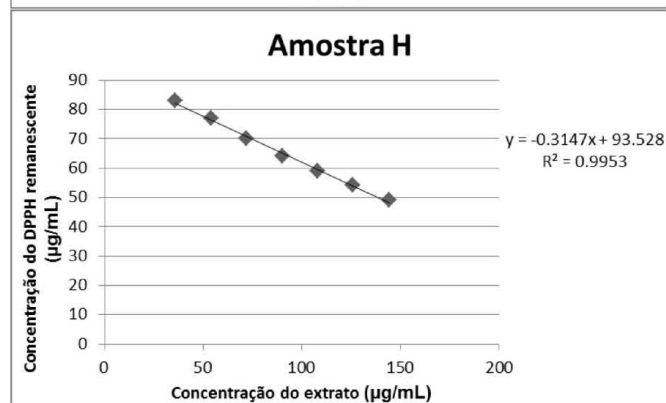
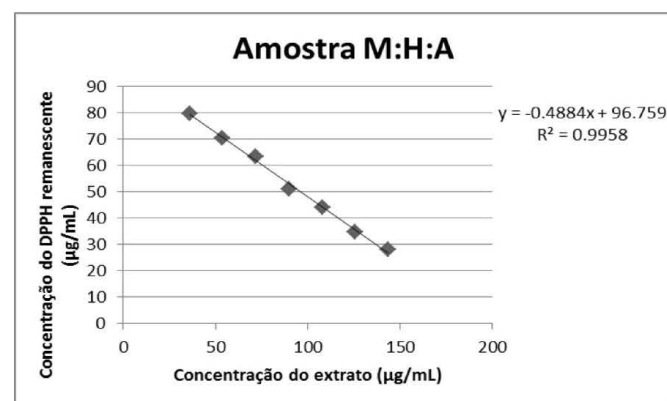
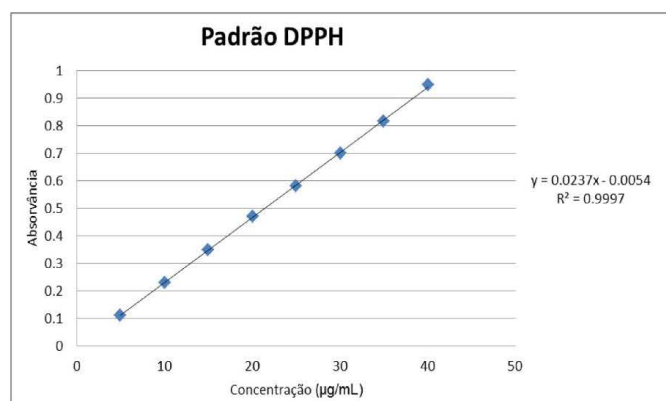
WANG, S. *et al.* Fingerprint quality control of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels by high-performance liquid chromatography coupled with discriminant analysis. v. 72, p. 434–436, 2007.

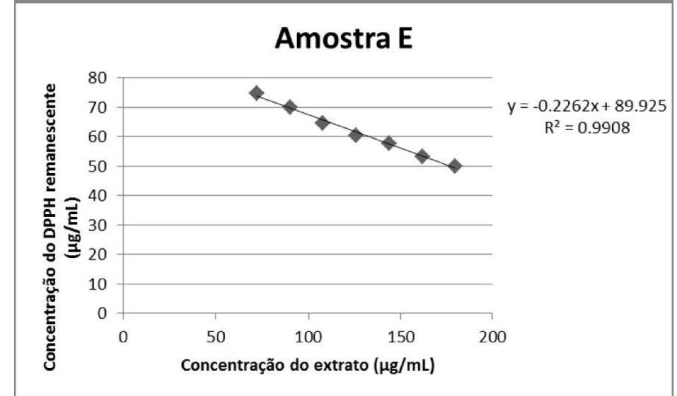
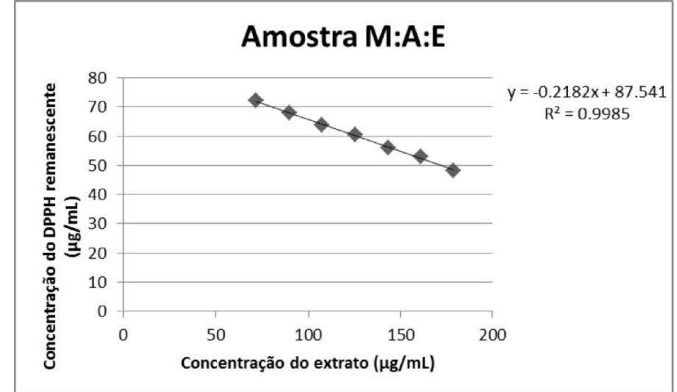
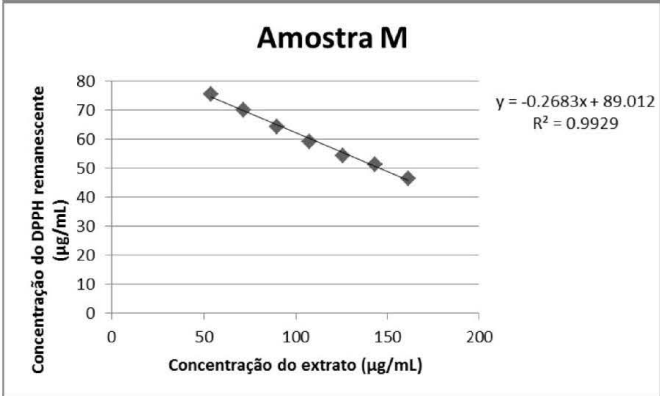
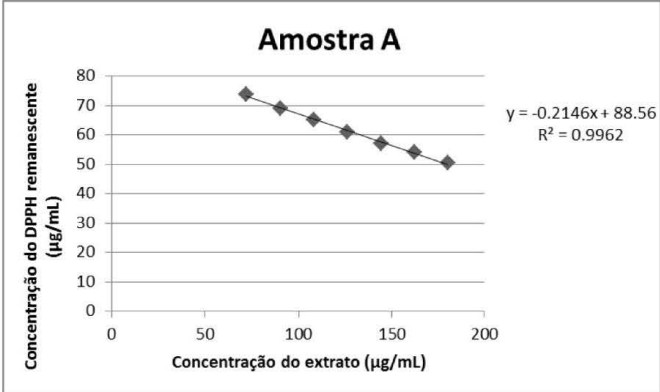
WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants**. v. 2, p. 97 – 113, 1999.

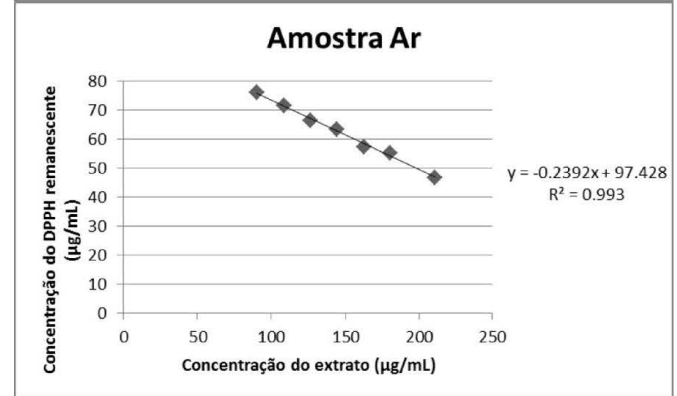
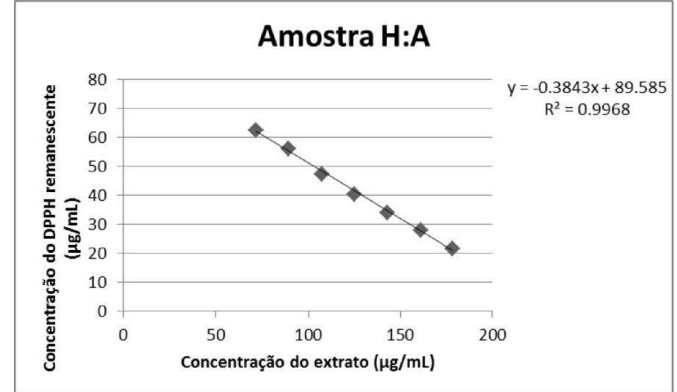
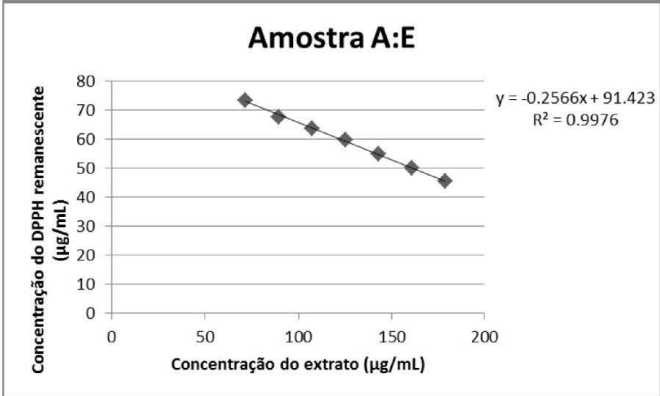
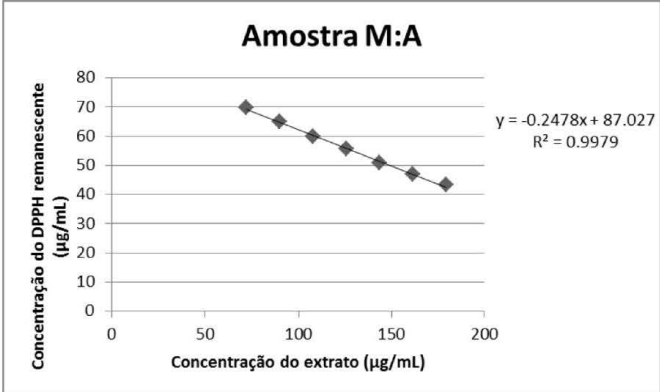
ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. v. 1p. 577–614.

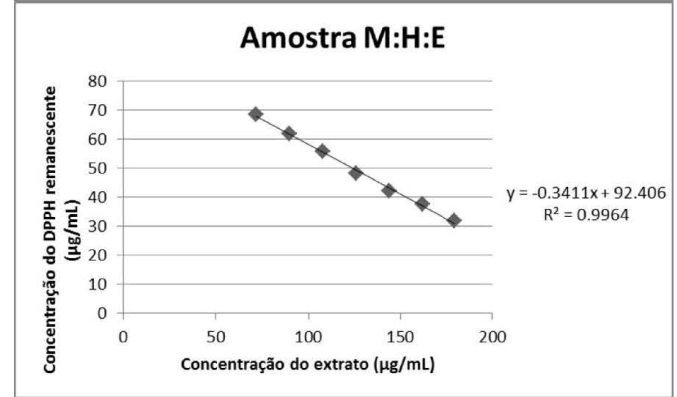
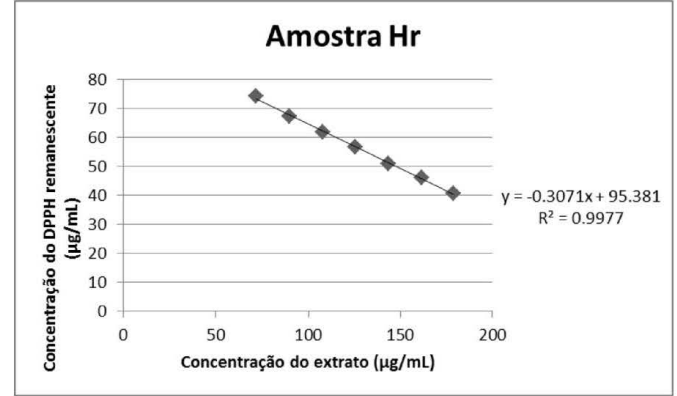
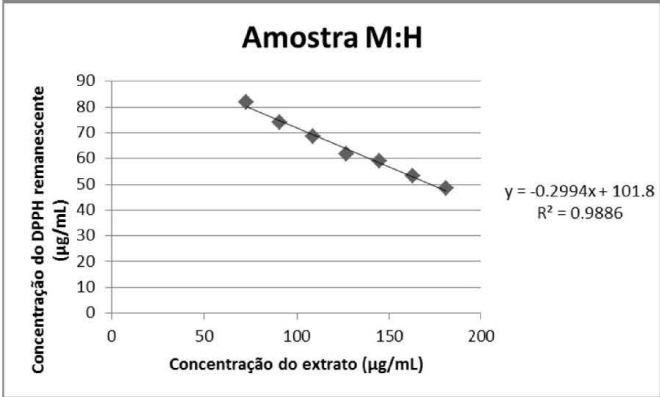
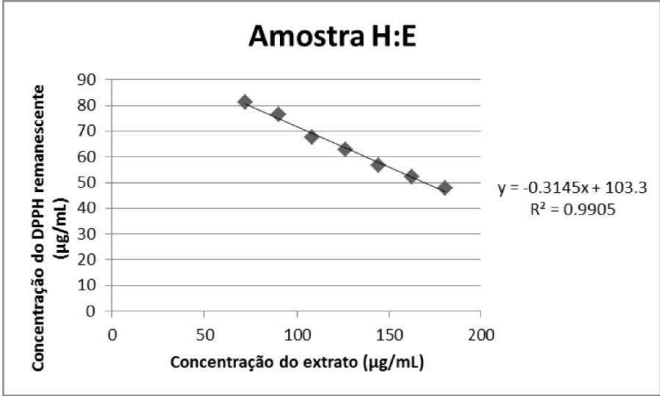
APÊNDICE

Apêndice A - Gráficos utilizados para o cálculo do IC₅₀ para avaliar a atividade antioxidante pelo método do radical DPPH•:

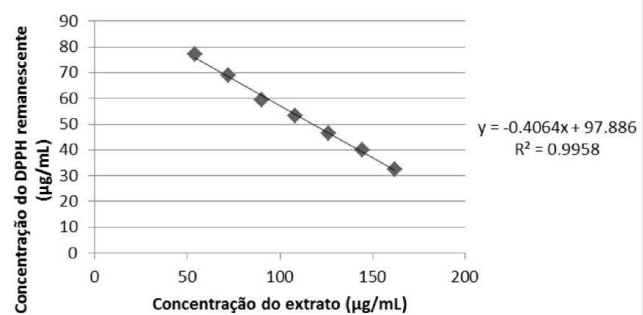




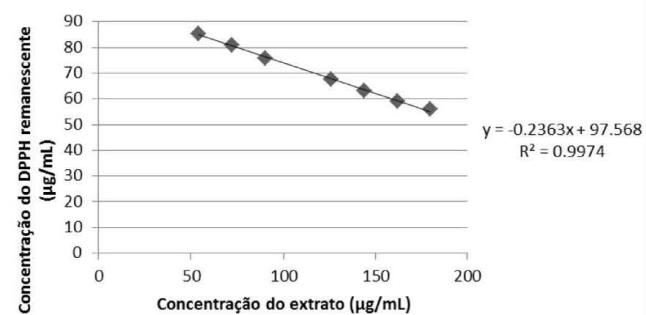




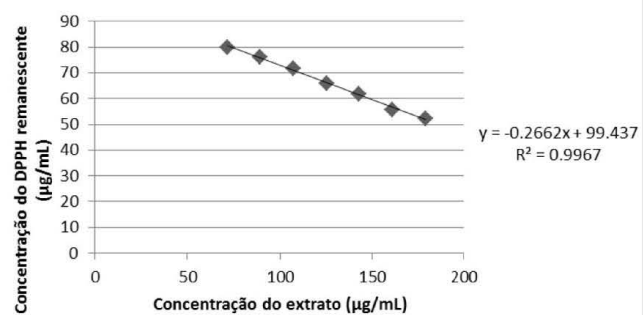
Amostra H:A:E



Amostra M:H:A:E



Amostra Mr



Ácido gálico

